

Einfluss einer Calpaininhibition auf die Störung der pulmonalvaskulären Permeabilität nach intravasaler Aktivierung von Granulozyten

**Experimentelle Untersuchungen
am Modell der isoliert ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von: Marc Oliver Maybauer
aus: Gelnhausen

Gießen 2003

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik I

Leiter : Prof. Dr. med. H. Tillmanns

Klinische Pathophysiologie und Experimentelle Medizin

Leiter : Prof. Dr. med. H. Neuhof

des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter:

Prof. Dr. med. Neuhof

Gutachter:

PD Dr. med. Kanse

Vorsitzender der Prüfungskommission:

Prof. Dr. med. Eikmann

Mitglied der Prüfungskommission:

Prof. Dr. med. Fleischer

Tag der Disputation: 23.07.2004

**Gewidmet meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit**

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	6
1.1	Abkürzungsverzeichnis	6
1.2	Einleitung	7
1.2.1	<i>Lungenödem und Acute Respiratory Distress Syndrome</i>	7
1.2.2	<i>Calpain-Calpastatin-Modell</i>	14
1.3	Fragestellung und Zielsetzung	18
2	MATERIAL UND METHODIK	19
2.1	Modell der isoliert ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge	19
2.1.1	<i>Verwendetes Tiermodell</i>	19
2.1.2	<i>Präparation und Organentnahme</i>	19
2.1.3	<i>Extrakorporales Zirkulationssystem</i>	24
2.1.4	<i>Perfusat</i>	25
2.1.5	<i>Monitoring der Versuche</i>	26
2.2	Granulozyten	27
2.2.1	<i>Isolierung von humanen Granulozyten (PMN)</i>	27
2.2.2	<i>Granulozytenzählung</i>	28
2.2.3	<i>Lösungen zur PMN-Granulozytenseparation</i>	29
2.2.3.1	Percoll®	29
2.2.3.2	Hanks-Hepes-Puffer (HBSS-Puffer)	29
2.2.3.3	Nährmedium	30
2.2.3.4	Immunglobulin IgG	30
2.2.4	<i>Herstellung von hitzedenaturiertem Immunglobulin (IgG*)</i>	30
2.3	Verwendete Inhibitoren	31
2.3.1	<i>Inhibitor-Cocktail</i>	31
2.3.1.1	Voltaren®	31
2.3.1.2	WEB 2086	32
2.3.1.3	Fenistil®	32
2.3.1.4	Pepdul®	32
2.3.2	<i>Calpaininhibitoren</i>	33

2.4 Versuchsdurchführung	34
2.5 Laborchemische Analyse	35
2.5.1 <i>Quantitative Bestimmung der PMN-Elastase</i>	35
3 STATISTIK	36
3.1 Statistische Auswertung	36
4 ERGEBNISSE	37
4.1 Zunahme des Lungengewichtes (Ödembildung)	37
4.2 Pulmonalarterieller Druck	38
4.3 Freisetzung der PMN - Elastase	38
4.4 Freisetzung von Histamin	39
4.5 Abbildung 1	40
4.6 Abbildung 2	41
4.7 Abbildung 3	42
4.8 Abbildung 4	43
5 DISKUSSION	44
6 ZUSAMMENFASSUNG	48
7 LITERATURVERZEICHNIS	50
8 DANKSAGUNG	69
9 LEBENSLAUF	70

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

1.1 Abkürzungsverzeichnis

α_1 – PI	α_1 – Proteaseninhibitor
α_2 – M	α_2 – Makroglobulin
AA	Arachidonsäure
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome
BE	Base Excess
COX	Cyclooxygenase
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
EIA	Enzymimmunoassay
EKMO	extrakorporale Membranoxygenation
IgG*	hitzenedenaturiertes Immunglobulin G
IRT	immunreaktives Trypsin
KHHP	Krebs - Henseleit - Hydroxyethylstärke - Puffer
KOD	kolloidonkotischer Druck
Ki	inhibitorische Aktivität
KI	Kallikrein – Inhibitor
LOX	Lipoxygenase
M	mol/l
MOF	Multi - Organ - Failure
PAF	Platelet Activating Factor
PAP	pulmonalarterieller Druck
PBS	phosphate buffered saline
pCO ₂	Kohlendioxid Partialdruck
PEEP	Positiv-endexpiratorischer Druck
PG E ₂	Prostaglandin E ₂
PG F _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
Pg	Pikogramm
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
pO ₂	Sauerstoff Partialdruck
PW	Perfusatwechsel
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TI	Trypsininhibitor

1.2 Einleitung

1.2.1 Lungenödem und Acute Respiratory Distress Syndrome

Das akute Atemnotsyndrom des Erwachsenen ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome), stellt in der modernen Intensivmedizin ein häufiges Krankheitsbild dar. In der Bundesrepublik Deutschland liegt die Inzidenz bei drei bis vier Erkrankungsfällen pro Hunderttausend Einwohnern und Jahr. In den USA rechnet man mit jährlich 150.000 Erkrankungen [9,10].

Der in der Regel akute Verlauf betrifft oft junge, vorher lungengesunde Patienten. Angaben über die Mortalität liegen bei über 50 Prozent, in einigen Arbeiten bis zu 70 Prozent und spiegeln die schlechte Prognose wider [11,12,53].

Ursächlich ist ein diffuser Schaden des Kapillarendothels der Lunge, der durch direkte und indirekte pulmonale Schädigungen entstehen kann.

Direkte Schädigungen der Lunge und Atemwege sind bedingt durch Aspiration, toxische Inhalation, Intoxikation und iatrogen durch operative Eingriffe [92]. Als Folge von Pneumonien kann es zum parapneumonischen ARDS kommen, welches eine zusätzliche Lungenschädigung, die über das eigentliche Ausmaß der Pneumonie hinausgeht, darstellt. Desweiteren kommen als Ursache des ARDS indirekte pulmonale Schädigungen durch Sepsis, Polytrauma, Verbrennung, Schock, Massentransfusion und Verbrauchskoagulopathie in Frage [90]. Untersuchungen von Ognibene et al. [93] ziehen auch eine Neutropenie als eine mögliche Ursache des ARDS in Betracht.

Der Verlauf dieser Erkrankung gliedert sich in drei Stadien und beginnt mit einer exsudativen Phase, in der durch gesteigerte Kapillarpermeabilität ein interstitielles Lungenödem entsteht, das mit Hypoxämie und respiratorischer Alkalose vergesellschaftet ist [16,19]. In der zweiten Phase kommt es zum Untergang der Pneumozyten Typ II und konsekutiv zur Abnahme der Bildung von Surfactant, woraus ein Flüssigkeitsübertritt in die Alveolen resultiert und das Bild des alveolären Lungenödems entsteht. Nach etwa einer Woche kommt es zur Bildung hyaliner Membranen, Mikroatelektasen und zu intrapulmonaler Shuntbildung, welche die Hypoxämie verstärkt [9].

In der dritten proliferativen Phase, die irreversibel verläuft, bildet sich eine progressive interstitielle Lungenfibrose aus. Diese führt durch Endothelproliferation der Alveolarkapillaren zur Perfusions- und Diffusionsverschlechterung, welche in einer respiratorischen Globalinsuffizienz, mit Hypoxämie, Hyperkapnie und respiratorischer Azidose endet [76].

Die Therapie besteht in intensivmedizinischer Überwachung und Beseitigung auslösender Noxen. Durch verbesserte und die Lunge schonende Beatmungstechniken konnte die Mortalität des ARDS in den Jahren von 1990 bis 1998 erheblich gesenkt werden [103]. Drucklimitierte Respiratorbehandlung mit kleinen Hubvolumina, positiv-endexpiratorischer Druck (PEEP) [24,79] und die Anwendung der „High Frequency Oscillatory Ventilation“ [53,101] stellen zur Zeit die Beatmungstherapie der Wahl dar.

Gegebenenfalls besteht die Therapie auch in partiellem Lungenersatz mit CO₂-Elimination durch extrakorporale Membranoxygenation [97].

Besonders gefährdet sind polytraumatisierte Patienten, da im Schock die ausgeprägte α -adrenerge Innervation des Intestinums zu dessen Minderdurchblutung führt. Zellhypoxie und lokale Azidose sind die Folge, Zellnekrosen werden nachweisbar. Diese Minderdurchblutung vermindert besonders im Magen die Schutzfunktion des Epithels gegen die Magensäure, sekundär entstehen Stressulzera. Auch im Darm wird infolge der Minderdurchblutung die Schutzbarriere gegenüber Bakterien und Endotoxin geschwächt, so dass die Resorption von Toxinen begünstigt ist. Diese Darmwandpermeabilität birgt die Gefahr der Einschwemmung toxischer Substanzen in den Kreislauf und einen daraus resultierenden Endotoxinschock. Deby-Dupont et al. [40] haben Hinweise dafür gefunden, dass immunreaktives Trypsin (IRT) ein Mediator des sepsisbedingten ARDS sein könnte.

Das Risiko einer Erregerselektion, zum Beispiel der Zunahme resistenter Bakterien, ist groß. Im Rahmen eines septischen Schockgeschehens ist die Gefahr des Multiorganversagens (MOF) sehr hoch [118]. In der Pathogenese des MOF spielt die Thrombinaktivität eine wichtige Rolle [117].

Das ARDS entsteht häufig aufgrund solcher nicht pulmonaler Ursachen, wobei die oben genannte Sepsis am häufigsten vorkommt [64,120,135].

Unabhängig von der Ursache laufen die gleichen pathophysiologischen Mechanismen ab, welche multifaktoriell sind, ineinandergreifen und schwer voneinander zu trennen sind.

Wesentliche Ursache der funktionellen und morphologischen Veränderungen ist die Permeabilitätsstörung des Kapillarendothels, bei deren Entstehung den Granulozyten eine zentrale Rolle zukommt. Im Rahmen der allgemeinen Entzündungsreaktion (SIRS) werden die Phagozyten stimuliert, die durch Chemotaxis massenhaft weitere Granulozyten in der Lunge akkumulieren. Granulozyten besitzen eine besondere Neigung zur Adhäsion an Endothelzellen [140]. Ihre Adhäsion wird durch divalente Kationen, chemotaktische Peptide und Komplementfaktoren, die auf Endothelrezeptoren wirken, vermittelt. Aktivierte Granulozyten setzen verschiedene Mediatoren, wie toxische Sauerstoff- und Hydroxylradikale, Superoxide, Proteasen (Elastase, Kathepsin G), den Endothelial Growth Factor und Metabolite des Arachidonsäurestoffwechsels (Prostaglandine, Prostazykline, Leukotriene, Thromboxane) frei [3,21,22,23,105,130].

Auch das Gerinnungssystem wird stimuliert, so wird zum Beispiel durch Elastase die Freisetzung des von Willebrandfaktors vermittelt [33,108]. Einige der genannten Mediatoren verursachen durch pulmonale Vasokonstriktion eine Hypertonie im Lungenkreislauf mit allgemeiner Gewebsschädigung, welche zu den oben genannten Permeabilitätsveränderungen der Membranen und zum Austritt von Flüssigkeit ins Interstitium führt [111,112,113].

Unter der Vielzahl der beteiligten Mediatoren wird in erster Linie den aus inflammatorischen Zellen (Leukozyten, Makrophagen) freigesetzten lysosomalen Proteasen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung des ARDS zugesprochen. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) enthalten in ihren azurophilen Granula lysosomale Enzyme, wie die Proteinasen Elastase, Kollagenase und Kathepsin. Diese Proteinasen werden bei Degranulation der PMN freigesetzt. Eine ihrer wichtigsten Vertreter ist die Elastase. Bei dieser Proteinase handelt es sich um ein einkettiges Polypeptid mit 218 Aminosäuren, einem Molekulargewicht von 30.000 Dalton und einem pH-Optimum im neutralen Bereich. Elastase kann auch durch Bradykinine liberiert werden

[14,25]. Elastase wird in Promyelozyten synthetisiert und in intrazellulären Granula gespeichert. Reife PMN enthalten bis zu 3 pg Elastase. Ausser in PMN finden sich Isoenzyme auch in Makrophagen, Thrombozyten und in Pankreas. Aufgabe der Elastase ist die Verdauung und der Abbau von phagozytiertem Material [15], wie Proteine oder strukturelle Komponenten (z.B. Elastin, Kollagen und Proteoglykane), welche als Nebenwirkung auch den Abbau von Gelenkknorpel bedingen können [106].

Der strukturelle Abbau von Plasma-Proteinaseinhibitoren beim septischen Schock ist am Multiorganversagen mitbeteiligt, da hier weitere Mediatoren, wie Interleukine (IL-1b, IL-6, IL-8), TNF- α und α_2 -M, freigesetzt werden und den multifaktoriellen Prozess in der Pathogenese des ARDS fördern [45,62,77]. Letztere Mediatoren lassen sich in der bronchoalveolären Lavage (BAL) von Patienten mit vorhandenem oder sich erst entwickelndem ARDS, bedingt durch alveoläre Kapillarschädigung, mit erhöhten Werten nachweisen. PMN sind hier mit acht- bis zehnfach erhöhten Werten messbar, wobei die Anzahl der PMN mit der pO₂-Differenz zwischen Alveolen und Arterien korreliert [65,110,136].

Inwieweit die in der BAL erhobenen Werte als Voraussageparameter genutzt werden können, wird sich in der Zukunft noch zeigen. Bei polytraumatisierten Patienten, steht die Elastasefreisetzung im Verhältnis zur Schwere des Traumas [42,43,44]. Auch die durch Laktatazidose bedingten niedrigen pH-Werte zeigen eine Korrelation mit der Mortalität, ohne dass sich geschlechtsspezifische Unterschiede finden [49,50,51].

Da proinflammatorische Mediatoren die Synthese von Ferritin stimulieren, stellt das Serumferritin ebenfalls einen Wert dar, der bei Risikopatienten und Patienten mit manifestem ARDS erhöht ist und zur Voraussage von dessen Entwicklung herangezogen werden könnte [37].

Bei Rezeptorkontakt mit Immunglobulin oder der Phagozytose von Fremdkörpern, die nicht inkorporiert werden können, wird Elastase in großen Mengen nach extrazellulär liberiert. Die daraus resultierende diagnostische Bedeutung der Elastase bei Beteiligung an Entzündungsreaktionen (SIRS) wird kontrovers diskutiert [91]. Wie weitreichend die Einflüsse der Elastase sind, zeigt sich daran, dass erhöhte Werte auch bei den verschiedensten Infektionen

der Atemwege gefunden werden [32], wie auch bei *Pseudomonas aeruginosa* infizierten Patienten mit zystischer Fibrose [125].

Die physiologischen Elastaseinhibitoren sind der α_1 -Proteinaseninhibitor und das α_2 -Makroglobulin, welche das Gleichgewicht zwischen Proteolyse und Proteolyseinhibition gewährleisten. α_1 -PI hat ein Molekulargewicht von 53 kDa und ist eine aus 394 Aminosäuren zusammengesetzte Polypeptidkette. Es wird in der Leber synthetisiert und ist Bestandteil der α_1 -Globulinfraktion des Serums. Beim gesunden Menschen finden sich Plasmakonzentrationen von 120-160 mg/dl [34].

Alpha₁-PI verfügt über eine hohe Affinität zur Leukozyten-Elastase und ist in der Lage, 90 Prozent der freien Elastase sehr stabil in 1:1-Komplexen zu binden [86]. Die Eliminationshalbwertszeit dieser Komplexe beträgt 60 min.

Alpha₂-Makroglobuline binden 10 Prozent der freien Elastase in Komplexen, welche einer Eliminationshalbwertszeit von zehn Minuten unterliegen [99]. Bei Entstehung eines Ungleichgewichtes, also einer Störung der Balance zwischen Proteinasefreisetzung und Proteinaseinhibitorkonzentration können verschiedene Erkrankungen resultieren. So wurde zum Beispiel die Entwicklung von Lungenemphysemen bei α_1 -PI-Mangel gehäuft beobachtet. Rauchen erhöht diese Imbalance zwischen Elastase und α_1 -PI, da sich Alveolarmakrophagen in den Bronchiolen, bedingt durch Zigarettenrauch, vermehren [1,56,66]. Durch neutrophile chemotaktische Faktoren, die von ihnen freigesetzt werden, kommt es zu einem Anstieg der polymorphkernigen neutrophilen Makrophagen. Proteolytische Enzyme werden freigesetzt, die dann durch Begünstigung der Imbalance die Emphysementwicklung fördern. Smith et. al. führten Untersuchungen mit Ozon durch, und es zeigte sich, dass Ozon die Aktivität von α_1 -PI senkt, so dass sich möglicherweise bei weiterer Umweltbelastung in Zukunft die Inzidenz des Lungenemphysems erhöhen könnte [28,119].

Durch die Granulozytenakkumulation und -stimulation beim ARDS kommt es zur erhöhten Elastasefreisetzung. Desweiteren werden toxische O₂-Metabolite liberiert. Toxischen O₂-Metabolite scheinen für die Permeabilitätssteigerung des

Gefäßendothels der Lungenstrombahn, wie sie für das ARDS typisch ist, mitverantwortlich zu sein [64,126,140].

Nach Fox et al. [52] kann eine Endothelschädigung auch durch Hyperoxie, welche bei reiner O₂-Beatmung von Ratten auftrat, entstehen.

Therapeutische Ansätze bieten Glukokortikoide, die durch Unterdrückung des Komplementsystems entzündliche Ödeme beeinflussen und membran-stabilisierende Effekte zeigen [59,60,61].

In weitergehende Überlegungen sollten aus oben genannten Gründen auch Antioxidantien einbezogen werden [20]. So kann zum Beispiel Allopurinol vor einer direkten Lungenschädigung durch Endotoxin schützen [21], auch eine Stärkung der antineutrophilen Elastasekapazität mit rekombinantem menschlichen Alpha₁-Antitrypsin, welches ein Molekulargewicht von 45000 Dalton hat, kommt in Betracht [27].

Therapeutischen Nutzen gegen die Entwicklung des ARDS versprach auch der Bowman-Birk-Inhibitor Eglin C, der ein 70-Aminosäuren-langes, thermostabiles Protein in einer dreidimensionalen Struktur darstellt, das ein Molekulargewicht von 8100 Dalton aufweist. Es wurde aus dem Lurch „*Hirudo medicinalis*“ isoliert und ist ein oxidationsresistenter Proteaseninhibitor. Aufgrund seines starken Antigencharakters kann Eglin C ausschließlich für Versuchszwecke und nicht im klinischen Alltag verwendet werden [2,13].

Zusätzlich konnten aus dem Lurch „*Hirudo medicinalis*“ zwei weitere Gruppen von Proteaseinhibitoren isoliert werden, das thrombinspezifische Hirudin und das Trypsin-, Plasmin- und Acrosininhibierende Bdekin [114].

Den größten Effekt zeigt jedoch Eglin C, das Endothelin 1, endogene Elastase, Kathepsin G, Proteasen vom Chymotrypsin Typ und die Aktivierung von Superoxiden aus PMN unterdrücken kann. Es ist daher als potenter Proteasen-inhibitor anzusehen [17,18,48,55,70,94,95,100].

Eglin C kann aufgrund seines Wirkungsspektrums den intravasalen Volumen- und Proteinverlust beim septischen Schock reduzieren, vor Elastase induziertem Emphysem schützen und die pulmonale Ödembildung, die nach PMN-Aktivierung auftritt, weitgehend reduzieren. Auf die Phagozytosefähigkeit

der PMN nimmt es jedoch keinen Einfluss. Durch freie Radikale kann Eglin C inaktiviert werden [39,109,122,123].

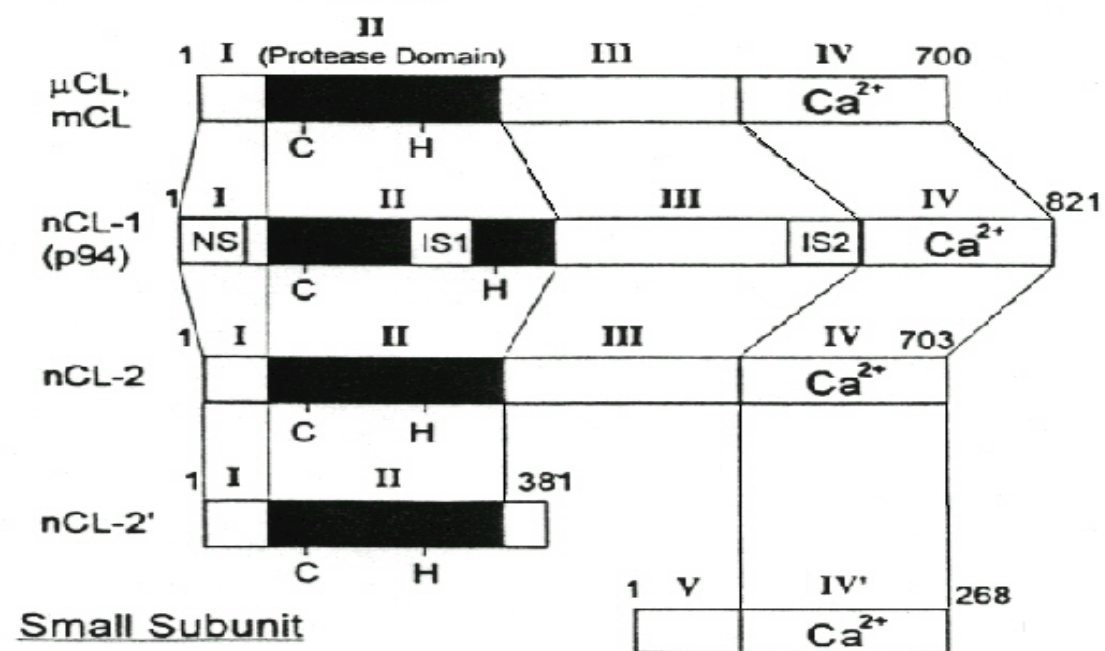
1.2.2 Calpain-Calpastatin-Modell

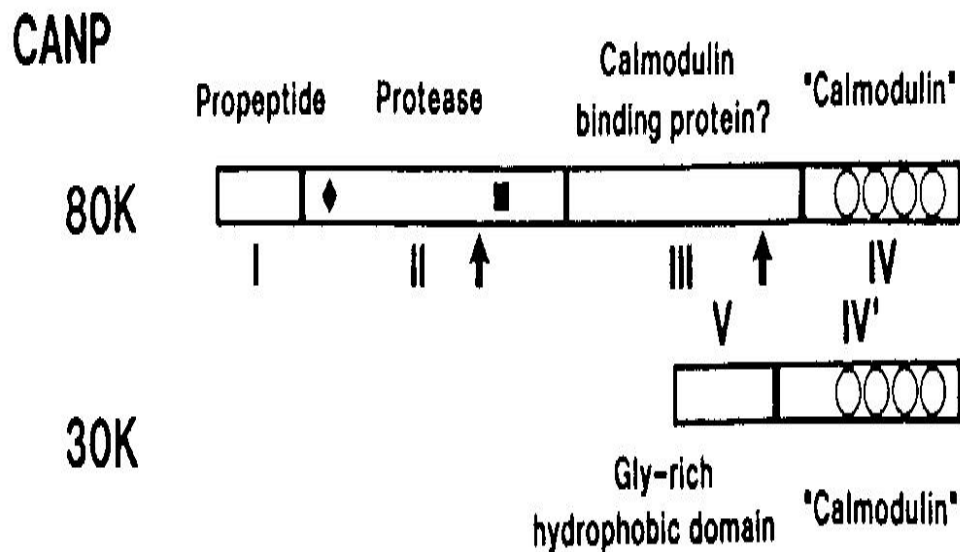
Bei den Calpainen handelt es sich um intrazellulär lokalisierte, Ca^{2+} -abhängige Proteasen. Bekannt sind bisher zwei ubiquitär vorkommende Calpaine, das Calpain I (μ -Calpain, fibrilläre Form), welches eine mikromolare Ca^{2+} -Abhängigkeit aufweist, sowie das Calpain II (m-Calpain, granuläre Form), dessen Ca^{2+} -Abhängigkeit im millimolaren Bereich liegt [72,78].

Diese Calpaine bestehen aus einer schweren Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 80 kDa mit vier Domänen (katalytische Untereinheit) und einer leichten Untereinheit von 30 Kilodalton mit zwei Domänen (regulierende Untereinheit) [6,139].

Neben diesen gibt es in der Familie der Calpaine noch eine Reihe anderer Proteasen, die gewebsspezifisch sind und in ihrer Struktur, Expression und Enzymaktivität Unterschiede zu den oben genannten aufzeigen. Spezifisch für die Skelettmuskulatur sind zum Beispiel die Typen p94 und nCL-1, sowie CL2 für den Magen [121].

Large Subunit Family





Unter Zugabe von Ca^{2+} dissoziiert Calpain in diese Untereinheiten [75]. Das μ -Calpain, welches eine aktive Proteinase ist und sich durch einen autolytischen Prozess selbst aktiviert, katalysiert die limitierte Proteolyse von m-Calpain in einer intra- und intermolekularen Reaktion (Heterolyse) [128]. Dieser autokatalytische Prozess von μ -Calpain (Calpain I) läuft beginnend mit der achtzig Kilodalton Untereinheit durch Ca^{2+} -Verbrauch über mehrere Zwischenprodukte (80 kDa - 78 kDa - 76 kDa - 30 kDa - 18 kDa) ab und ist damit in-vitro ein wichtiger Schritt in der Aktivierung von m-Calpain. Der genannte Aktivierungsprozess benötigt weniger freies Ca^{2+} als die Proteolyse [38]. Beide Untereinheiten werden benötigt, um die volle Enzymaktivität zu erreichen, wobei die dreißig Kilodalton Untereinheit die 80 kDa Untereinheit stabilisiert. In Gegenwart von Phospholipiden ist die kinetische Konstante zur Aktivierung jedoch stark erhöht, da Phosphatidylinositol die Ca^{2+} -Konzentration, die für die proteolytische Aktivierung von Calpain und seine Autolyse benötigt wird, senkt [36,57]. Im Tierversuch zeigt sich eine höhere Ca^{2+} -Sensitivität des Calpains beim Kaninchen als im Vergleich zum Affen [74,129,138,139].

Jedoch hängt die Calpainaktivität nicht nur vom Ca^{2+} -Gehalt, sondern auch von der intrazellulären Konzentration des Calpastatin ab. Calpastatin ist der endogene Inhibitor von Calpain und ist intrazellulär in der Nähe des Nukleus lokalisiert, während Calpain vermehrt im Zytoplasma und an der Zellmembran zu

finden ist. Calpastatin verfügt über vier inhibitorische Domänen (D₁-D₄) mit drei homologen Sequenzen (A, B, C) und inhibiert die proteolytische Aktivität, sowie die Bindungsfähigkeit des Calpains an Membranen [81]. Die Aktivität des Calpains und die inhibitorische Leistung des Calpastatins hängen vom intrazellulären Konzentrationsverhältnis beider Stoffe ab, wobei der Calpastatin-Spiegel von Wachstumshormonen moduliert wird [5]. Calpastatin kann durch Caspase in zwei Fragmente gespalten werden, eine hochmolekulare und eine niedermolekulare Variante entstehen hierbei. Die inhibitorische Potenz auf Calpain wird dadurch vermindert. Da Caspase und Calpain zur Familie der Cystein-Proteinasen gehören, die an der Apoptose beteiligt sind, lässt sich vermuten, dass ein Zusammenspiel beider Proteasen zur Reduktion der Calpastatin-Aktivität führt und damit ein Überwiegen des Calpain im Verhältnis zu Calpastatin resultiert [133,134]. Weitere Inhibitoren des Calpain sind das Calpeptin, ein Cystein-Proteaseninhibitor, der zellpermeabel ist, Calpain-spezifisch wirkt und zusätzlich auf bisher noch ungeklärte Weise Östrogen-Rezeptoren auf Tumorzellen hemmt [115], sowie das High-Molekular-Weight-Calmodulin-Bindungsprotein (HMW-Ca-MBP) von dessen drei Peptidsequenzen, zwei der Struktur des Calpastatin entsprechen [71]. Weitere Inhibitoren sind Calmodulin-Antagonisten [69], diverse synthetische Proteinaseninhibitoren und Dimethyl- α -Ketophosphonate [127]. Der Abbau von endogenen Proteinen durch Calpain lässt sich in gewissem Maße auch durch Glukokortikoide hemmen, die von ihrem Wirkprofil jedoch den Calpaininhibitoren unterlegen sind [4,54].

Kommt es zu Störungen im Konzentrationsverhältnis zwischen Calpain und Calpastatin oder zur Störung der Ca^{2+} -Homöostase mit intrazellulärer Ca^{2+} -Erhöhung, folgt eine Aktivierung der Cysteinprotease Calpain. Nach Aktivierung des Calpains an der Zellmembran spaltet es unter anderem submembranöse Proteine, das Zytoskelett und Myofibrillenproteine und führt zum Abbau membranöser Ca^{2+} -Kanäle [7,8,131]. Dies führt zu Veränderungen in Struktur und Funktion dieser Gewebe. Desweiteren kommt es zur katalysierten Aktivierung von Proteinkinase C, diese phosphoryliert Calpastatin und führt zur Verminderung der inhibitorischen Aktivität, welches ein weiteres Überwiegen von Calpain im entstandenen Ungleichgewicht begünstigt. Eine Beteiligung von

Calpain an Entzündungsprozessen ist ebenfalls nicht auszuschließen [73,87,104]. Eine Calpainaktivierung durch eine Imbalance der Calpain-Regulation kann auch indirekt durch eine Hypoxie ausgelöst werden. Die proteolytischen Effekte des Calpains führen zum Abbau der Zellmembranen [102]. Iizuka untersuchte diesen hypoxiebedingten Effekt an Herzmuskelzellen. Durch Gabe eines Cystein-Proteaseninhibitors (E 64) und von Calpastatin konnte der Zelltod verlangsamt werden [67].

Urthaler konnte mit dem Calpaininhibitor MDL 28170 eine Hemmung von aktiviertem Calpain bei ischämischen Herzmuskelzellen finden [132]. Nach Yoshida et al. [137] ist Calpain auch für die reperfusionsbedingte Proteolyse von Calspectin verantwortlich zu machen. Eine Calpainaktivierung ist ebenfalls in anderen durch Hypoxie geschädigten Geweben, wie zum Beispiel bei neurodegenerativen Prozessen nach zerebraler Ischämie, nachweisbar [30,96]. Hier konnten neuroprotektive Effekte von Calpaininhibitoren aufgezeigt werden [29,31,68,83].

Bisher wurde bereits eine Vielzahl von Untersuchungen durchgeführt, die eine Beteiligung von Calpain an zellulären Schädigungen aufzeigen, wie sie zum Beispiel nach einem Myokardinfarkt oder zerebralem Schlaganfall auftreten. Calpaininhibitoren zeigten protektive Effekte auf die verschiedenen Gewebe [102].

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Die Wirkung von Calpainen und deren Inhibitoren auf die Lunge ist bisher noch weitestgehend unbekannt. Die an anderen Organen gewonnenen und oben genannten Erkenntnisse zugrundeliegend, zielen die Untersuchungen meiner Arbeit darauf, festzustellen, ob Calpaininhibitoren die Entwicklung eines Lungenödems nach Zugabe von aktivierten Granulozyten vermindern oder ganz unterdrücken können.

Desweiteren werden die Einflüsse von Calpaininhibitoren auf die Elastase-, sowie Histaminfreisetzung untersucht, da am Gefäßendothel haftende, aktivierte Granulozyten eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des ARDS einnehmen, indem sie Proteasen und Sauerstoffradikale liberieren, die das Gefäßendothel schädigen und somit eine Permeabilitätsstörung in Gang setzen.

2 MATERIAL UND METHODIK

2.1 Modell der isoliert ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge

2.1.1 *Verwendetes Tiermodell*

Alle Versuche wurden an dem Modell der isoliert ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge durchgeführt. Als Organspender für die Untersuchungen dienten 22 Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) aus einer Standardkoloniezucht der Behring-Werke in Marburg. Die verwendeten Tiere beiderlei Geschlechts hatten ein durchschnittliches Gewicht von 2850 ± 250 g und wurden bis kurz vor Versuchsbeginn mit Altromin®-Standarddiät und Wasser ad libitum ernährt. Die Versuche wurden entsprechend den Regeln des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und als Organentnahmen dem Regierungspräsidenten in Giessen angezeigt.

2.1.2 *Präparation und Organentnahme*

Nach Einführen einer Butterfly®-Kanüle 21G in die Ohr randvene wurden die Versuchstiere mit 60-90 mg Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, Rhone Merieux GmbH, Laupheim) pro kg Körpergewicht intravenös bis zum Erlöschen jeglicher Schmerzreize anästhesiert, auf dem Rücken gelagert und fixiert.

Anschließend wurde ein subkutan es Lokalanästhetikadepot von 10 ml einer 2 %igen Lidocain-HCl-Lösung (Xylocain®2%, Astra Chemicals, Wedel) prätracheal gesetzt und die ventrale Hals-, Thorax- und Abdomenpartie rasiert.

Nach Wirkungseintritt des Lokalanästhetikums wurde über eine mediane Inzision die Trachea freigelegt, eröffnet und mittels eines Kunststoffschlauches (\varnothing innen: 3,5 mm / außen: 5,0 mm) intubiert.

Kurz vor der Intubation wurden dem Tier weitere 60 mg Pentobarbital-Natrium über die Ohrvene injiziert, um die Spontanatmung aufzuheben und einer Vagusreizung mit Bronchospasmus durch die Intubation und das Einbinden der Trachealkanüle vorzubeugen.

Unmittelbar mit der Intubation beginnend wurden die Kaninchen mittels einer volumengesteuerten Kolbenpumpe (Starlingpumpe Typ 874072, Braun, Melsungen) kontinuierlich bis zum Ende des Versuches mit einer Atemfrequenz von 30 /min, einem Atemzugvolumen von 25 ml, einem daraus resultierenden Atemminutenvolumen von 750 ml/min und einem PEEP von 0,5-1,5 cmH₂O kontrolliert beatmet. Das Inspirations- Expirationsverhältnis betrug 1:1. Zur Gasversorgung diente Raumluft, der nach Bedarf O₂ und 4 %iges CO₂, aus Gasvorratsflaschen (Messer-Griesheim Sondergase, Duisburg) nach Reduktion des Flaschendruckes über Vorventile mit Hilfe von Nadelventilen feindosiert beigemischt wurde.

Im Anschluss an die Intubation wurde die Narkose mit weiteren 60-90 mg Pentobarbital intravenös unter palpatorischer Kontrolle der Herzfrequenz nochmals vertieft und 1000 I.E. Heparin (Liquemin[®], Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) pro kg Körpergewicht zur Vollheparinisierung injiziert. Über eine mediane, entlang der Rippenbögen nach lateral erweiterte Laparotomie wurde das Diaphragma von kaudal dargestellt und unter Eröffnung beider Pleurahöhlen vom Sternum und den Rippen abpräpariert.

Der Processus xiphoideus wurde angehoben, das Perikard und das obere Mediastinum scharf von der Rückseite des Sternums abgetrennt und anschließend der Thorax über eine mediane Sternotomie bis zur Inzision der Tracheotomie eröffnet. Nachdem die Sternotomieränder mit Kocherklemmen angeklemt und seitlich unter Aufspreizen des Thorax fixiert waren, wurde der Thymus abpräpariert und die ventralen Anteile des Perikards entfernt. Der Truncus pulmonalis und die Aorta ascendens wurden dargestellt und mit losen Ligaturen versehen.

Nach Fixierung der Herzspitze mittels einer Moskitoklemme wurde der rechte Ventrikel knapp unterhalb der Pulmonalisklappenebene eröffnet und ein Silikonkatheter mit abgerundeter Polyethylen-Knopfkanüle (Ø innen: 3,0 mm, außen: 5,0 mm) unter laufender Perfusion mit zellfreiem Krebs-Henseleit-Hydroxylethylstärke-Puffer (KHHP; siehe 2.1.4) durch die Semilunarklappe in den Truncus pulmonalis vorgeschoben und dort mittels Ligatur fixiert.

Nach Sicherung der Perfusion der Lunge wurden beide Herzventrikel eröffnet, so dass das aus der pulmonalen Zirkulation kommende Perfusat ungehindert aus den Venae pulmonales ablaufen konnte. Abschließend erfolgte die Isolation der Lunge aus dem Thorax. Hierzu wurde die Trachea proximal der Intubationsstelle durchtrennt, Lunge und Reste des Herzens im hinteren Mediastinum abgesetzt und von der Vena cava inferior und dem Oesophagus getrennt.

Danach wurde das Lungenpräparat zusammen mit den Beatmungsschläuchen und dem Pulmonalkatheter an einer elektronischen Wägezelle (Hottinger-Baldwin Messtechnik, Darmstadt) in einer befeuchteten Wärmekammer (38,5 °C) berührungsfrei befestigt und in den extrakorporalen Kreislauf integriert. Die während der Präparation entstandenen Atelektasen wurden durch Kompression des Expirationsschenkels des Beatmungsschlauches zur Entfaltung gebracht.

Nun wurde der Flow über eine Rollerpumpe (Masterflex® 7566-10, Cole & Palmer Instruments, Chicago), beginnend mit einem Flow von 30 ml/min über einen Zeitraum von 15 min kontinuierlich bis auf 200 ml/min gesteigert. Der sich nun anschließende Perfusatwechsel hatte das Ziel, die während der Präparation liberierten Mediatoren (Thromboxane, Prostaglandine, etc.) und entstandenen Gewebsablösungen sowie Blutzellbestandteile aus der Zirkulation zu entfernen, um so ein möglichst reines Perfusat zu erhalten, das eine homogene und stabile Perfusion der Lunge gewährleistet.

Nachdem die Gewichtsregistrierung auf Null gesetzt worden war, begann eine steady-state-Periode von 15 min Dauer.

Für die weiteren Versuche wurden nur solche Organpräparationen ausgewählt, die während dieser 15 Minuten ihr Gewicht nur minimal änderten

(Abweichung ± 1 g vom Ausgangsgewicht) und einen konstanten pulmonal-arteriellen Druck (Abweichung < 2 mmHg) aufwiesen. Außerdem mussten die sichtbaren subpleural gelegenen Parenchymanteile homogen weißlich erscheinen, das heißt, sie durften keine Anzeichen von hämorrhagischen bzw. nicht perfundierten Kapillarbezirken oder einer bereits bestehenden Ödembildung aufweisen. Im Anschluss an die stabile steady-state-Phase wurde mit den eigentlichen Versuchen begonnen.

2.1.3 Extrakorporales Zirkulationssystem

Das Perfusionssystem setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen: Einem doppelwandigen Glasgefäß (Ströhmnn Glastechnik, Herborn) mit einem Volumen von 250 ml, das als Vorrats- und Auffangbehälter für das rezirkulierende Perfusat diente, sowie 3 gleichartiger Gefäße die über 3-Wege-Hähne parallel zum ersten geschaltet waren und bei Bedarf in die Zirkulation mit einbezogen werden konnten.

Das Perfusat wurde von dem Hauptreservoirbehälter ausgehend mittels einer Rollerpumpe (Masterflex® 7566-10, Cole & Palmer Instruments, Chicago) mit regulierbarer Förderleistung über einen 40 µm Filter (Pall Blood Transfusion Filter SQ 40 SE, Pall Biomedizin, Dreieich) und eine Blasenfalle durch den afferenten Katheter in die Arteria pulmonalis gepumpt.

Während des Versuches hing das Lungenpräparat in einer feuchten, doppelwandigen Glaskammer (Ströhmnn Glastechnik, Herborn). Sowohl diese, als auch die 4 Perfusatbehälter wurden mittels eines Wasserthermostates (Thermomix UB, Braun, Melsungen) beheizt, um das Perfusat auf einer konstanten Temperatur von 37 °C zu halten.

Nach Passage der Lungenstrombahn floss das Perfusat über die Venae pulmonales zurück in das Hauptperfusatreservoir.

Das Schlauchsystem bestand aus Polyethylen - (Bentley ByPass®, Tubings Inc.) und Silikonschläuchen (Deutsch & Neumann) mit Durchmessern von 5,0 / 8,0 mm (innen / außen) im arteriellen, sowie 6,0 / 9,0 mm im venösen Schenkel. Die einzelnen Segmente waren mit Polyethylen- und Polypropylen-Schlauchverbindern (Bürkle NeoPlast® oder Nalge Connectors®) entsprechender Stärke verbunden.

Alle Halterungen und die Deckel für Perfusat- und Organgefäße bestanden aus Polymethacrylat (Plexiglas®, Röhm Industrie, Darmstadt).

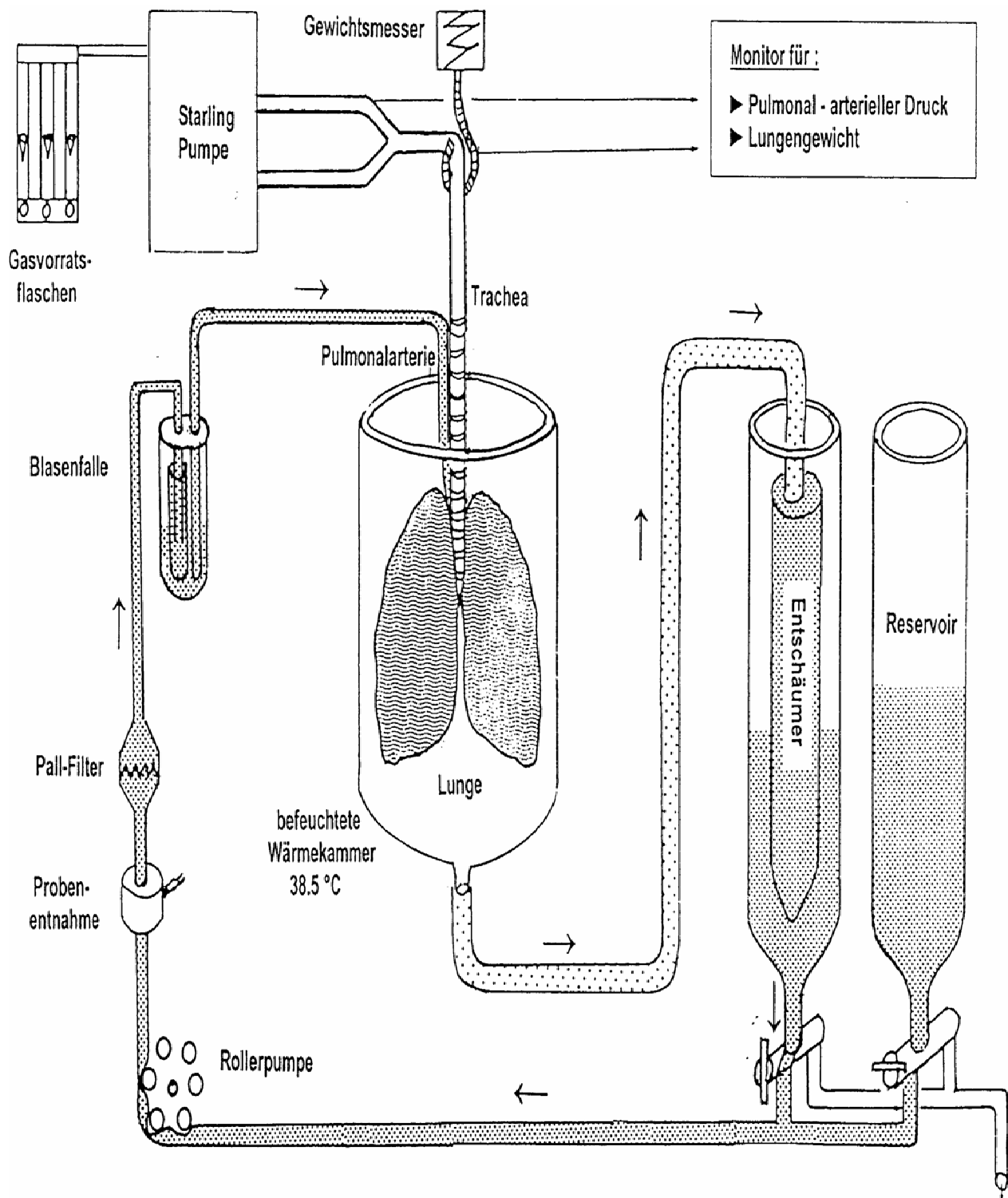
Das gesamte Schlauchsystem wurde mehrfach verwendet und deshalb nach Abschluss eines jeden Versuches zusammen mit den Glasbehältern mit heißer Mucapur®-Reinigungslösung rezirkulierend perfundiert, dann über eine halbe

Stunde mit heißem Wasser und abschließend mit Aqua dest. gespült und mit Pressluft getrocknet.

Vor Beginn eines neuen Versuches wurde das System nach dem Zusammenstecken mit 38,5 °C warmer 0,9 %iger Kochsalzlösung mehrfach rezirkulierend gespült.

Durch variable CO₂-Beimischung wurde der pH-Wert im Perfusat auf Werte zwischen 7,41-7,43 einreguliert.

Im zuleitenden Schlauchsystem war eine Vorrichtung zwischengeschaltet, um Perfusatproben zu entnehmen. In den regelmäßig abgenommenen Proben konnte der pH-Wert, der pO₂ und der pCO₂ mit dem ABL 330 (Radiometer-Copenhagen) überprüft werden.



2.1.4 Perfusat

Zur Perfusion der Lunge wurde Krebs-Henseleit-HES-Puffer verwendet. Pro Versuch wurden 2 Liter Perfusat täglich frisch angesetzt. Durch den Zusatz von 0,9 %igem Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) wurde der pH-Wert auf 7,42 eingestellt. Da die Perfusionslösung während des Versuchsablaufes alkalischer wurde, musste durch CO_2 -Gaszugabe der pH-Wert auf Werte zwischen 7,41-7,43 nachreguliert werden.

Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers	
HES® 10% (Fresenius, Bad Homburg)	1300 ml
Glucose 10% (Fresenius, Bad Homburg)	50 ml
Natriumhydrogencarbonat 0,9% (Fresenius, Bad Homburg)	ca. 250 ml
Elektrolytlösung A	400 ml

Inhaltsstoffe für 1 Liter Elektrolytlösung A	
NaCl	7,156 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,50 g
KH_2PO_4	0,75 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1,35 g
KCl	1,262 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Endkonzentrationen im Puffer	
Na^+	138,0 mmol/l
Cl^-	110,8 mmol/l
K^+	4,50 mmol/l
Ca^{2+}	2,38 mmol/l
Mg^{2+}	1,33 mmol/l
PO_4^-	1,10 mmol/l
HCO_3^-	12 mmol/l
Glucose	12 mmol/l
Osmolalität	$\approx 330 \text{ mosmol/kg}$

2.1.5 Monitoring der Versuche

Das Monitoring wurde während der Versuche kontinuierlich sowie diskontinuierlich durchgeführt.

Fortlaufend wurde das Organgewicht mit Hilfe einer elektronischen Wägezelle (Typ U1, Nr. 25137, Messbereich 0-500 g, Auflösung 0,01 g) mit nachgeschaltetem Messverstärker (KWS 3073, Hottinger-Baldwin Messtechnik, Darmstadt) gemessen.

Die Druckmessung in der Arteria pulmonalis erfolgte über einen kleinen Polyethylenkatheter, der in den Perfusionskatheter eingelegt war. Dieser innenliegende Katheter war über eine konventionelle Druckmessleitung mit einem Druckwandler verbunden (Combitrans Monitoring-Set Mod.II, Braun, Melsungen). Der Druckdom wurde mit Aqua dest. der Innenkatheter und die Druckleitung luftblasenfrei mit physiologischer NaCl-Lösung gefüllt.

Die von der Wägezelle und von dem Druckwandler kommenden Signale wurden über Vor- und Endverstärker (Hellige-II-Gerätegeneration, Hellige, Frankfurt) ausgesteuert und auf einem Sechs-Kanal-Kompensationsschreiber (R-10 Series, Rikadenki, Freiburg) aufgezeichnet.

Neben diesen Messgrößen wurden diskontinuierlich, zu festgelegten Zeitpunkten, aus Perfusatproben mit einem Blut-Gas-Analysator (ABL 300, Radiometer-Copenhagen) die Werte für physikalisch gelösten Sauerstoff, Kohlendioxid, Standardbikarbonat, Base Excess und der pH-Wert bestimmt.

2.2 Granulozyten

2.2.1 *Isolierung von humanen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN)*

Als Blutspender standen gesunde Probanden beiderlei Geschlechts zur Verfügung. Pro Versuch wurden 100 ml heparinisiertes Vollblut (10 I.E. pro ml Blut) benötigt. Die Isolation der Granulozyten aus Vollblut erfolgte durch Percoll®-Dichtegradientenzentrifugation nach der Methode von Hjorth et al. [63]. Der Dichtegradient wurde jeweils in 20 Reagenzgläsern (13 ml, Sarstedt, Nr. 55468, 51588, Nümbrecht) hergestellt, indem zunächst je 4 ml 55 %ige Percoll®-Lösung (siehe 2.2.3.1) eingefüllt wurden. Mit Hilfe von Auslaufpipetten (5 ml, Greiner, Nürtingen) und Kanülen (0,9 x 70 mm) wurden 4 ml einer 67 %igen Percoll®-Lösung vorsichtig unterschichtet. Die Verdünnung des Dichtegradienten erfolgte, indem 10 ml 1.5 M NaCl-Lösung (aus NaCl-Trockensubstanz pro analysi, Merck, Darmstadt) zu 55- bzw. 67 ml Percoll® gegeben und mit Aqua dest. (steril, Braun, Melsungen) ad 100 ml aufgefüllt wurden. Je 5 ml des heparinisierten Vollblutes wurden mit einem Überlaufschlauch auf die Flüssigkeitssäulen gebracht. Anschließend erfolgte die Separation der Zellen durch Zentrifugation (Rotixa/RP, Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen) bei 1400 U/min für 20 min bei 25 °C. Dabei betrug die Anlaufzeit 60 s und die Abbremszeit 2 min. An der Schichtgrenze zwischen Percoll® 55 % und 67 % erschienen die PMN als weiße Bande. Die gebildete Serumphase und ein Drittel der oberen Percoll®-Schicht wurden mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und verworfen. Nun wurde die sich darunter befindende PMN-haltige Percoll®-Schicht mittels einer Eppendorf-Pipette abgehoben und in 4 Reagenzgläser (Falcon-Röhrchen®, Becton Dickinson Co., New Jersey, USA) zu 50 ml eingebracht und mit einem vorgewärmten (37 °C) HBSS-Puffer (siehe 2.2.3.2) resuspendiert. Die Suspension wurde ebenfalls zentrifugiert (5 min bei 25 °C und 1720 U/min, keine Anlauf- und Abbremszeit) und der entstehende Überstand abgesaugt. Anschließend wurden die PMN-Granulozyten mit 50 ml vorgewärmtem Nährmedium (siehe 2.2.3.3) resuspendiert und in einem auf 37 °C erhitzten

Wasserbad (Köttermann, Typ 3041, Hänigsen) unter Begasung mit 4 % CO₂, 17% O₂ und 79% N₂ (Messer-Griesheim Sondergase, Duisburg) bei einem Gasfluss von 1 l/min für 90 min inkubiert.

Danach erfolgte eine weitere Zentrifugation über 5 min bei 1720 U/min.

Das entstandene Zellpellet wurde in 8 ml Hanks-Hepes-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert.

2.2.2 Granulozytenzählung

Heparinisiertes Spenderblut wurde in einer Leukozytenpipette (Hirschmann[®], Techcolor) bis zur Marke 1,0 aufgezogen und mit Türk'scher Lösung (Essigsäure-Gentianaviolett-Lösung, Nr. 9277, Diagnostic Merck, Darmstadt) aufpipettiert, wodurch die Granulozyten eingefärbt und die vorhandenen Erythrozyten aufgelöst wurden. Dann wurde die Pipette für 3 bis 5 min auf einem Rüttler (Assistent Nr. 21562) bewegt. Anschließend wurden zwei Neubauer-Zählkammern gefüllt und unter dem Mikroskop jeweils die vier grossen Eckquadrate (Gesamtvolumen 0,4 ml) ausgezählt. Aus den beiden erhaltenen Zahlen wurde der Mittelwert gebildet und mit dem Umrechnungsfaktor 25 multipliziert. Der so erhaltene Wert gibt die Zahl der PMN pro µl PMN Suspension an.

2.2.3 Lösungen zur PMN-Granulozytenseparation

2.2.3.1 Percoll®

Percoll® (Nr. 17-089101, steril, Pharmacia, Uppsala, Schweden)

besteht aus Polyvinylpyrrolidonbeschichteten Silikon-Partikeln, mit einer Dichte von $\rho = 1,129 \text{ g/ml}$. Die verwendete Methode nach Hjorth [63] liefert PMN-Leukozyten mit einer 55 %igen Ausbeute und 97 %iger Reinheit.

55 % Percoll ($\rho = 1,077 \text{ g/ml}$)	55 ml	Percoll®
	10 ml	1.5 M NaCl
	35 ml	Aqua dest.
67 % Percoll ($\rho = 1,095 \text{ g/ml}$)	67 ml	Percoll®
	10 ml	1.5 M NaCl
	21 ml	Aqua dest.
1.5 M NaCl: 87,66 g NaCl ad 1000 ml Aqua dest.		

2.2.3.2 Hanks-Hepes-Puffer (HBSS-Puffer)

Aqua dest.	900 ml
Hepes Cell Culture®, Nr. H-9136, N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonat, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA	6 g
Hanks BSS® (buffered saline solution) Magnesium, Nr. 14185037, Gibco BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, Schottland	100 ml
titriert mittels 1 M NaOH (Merck, Darmstadt) auf einen pH von 7,4	

2.2.3.3 Nährmedium

Medium RPMI 1640 mit NaHCO₃, ohne Glutamin, steril, Nr. 209945, Boehringer, Mannheim	100 ml
Fetales Kälberserum, steril, Nr. 10500064, Gibco BRL, Life Technologies Ltd., Paiseley, Schottland	5 ml
Penicillin-Streptomycin, Nr. 210404, Boehringer, Mannheim	200 µl

2.2.3.4 Immunglobulin (IgG)

Beriglobin[®], Centeon Pharma GmbH, Marburg

1 ml enthält 160 mg humanes Protein, davon mindestens 95 % Antikörper gegen Hepatitis-A-Virus.

2.2.4 Herstellung von hitzedenaturiertem Immunglobulin G (IgG*)

3200 mg Beriglobin[®] (siehe 2.2.3.4) wurden mit 620 ml PBS (phosphate buffered saline) verdünnt, im vorgewärmten Wasserbad bei 63 °C, 80-minutenlang inkubiert und intermittierend geschüttelt, bis eine Aggregatbildung sichtbar wurde. In einer Kühlzentrifuge wurde dieser Ansatz bei 4 °C mit 1500 g über einen Zeitraum von 30 min zentrifugiert. Der Überstand (unlösliches IgG*) wurde mit 128 ml Krebs-Henseleit-HES-Pufferlösung resuspendiert und in 8 ml Aliquots, welche jeweils 200 mg des hitzedenaturierten Immunglobulins beinhalten, bei –30 °C eingefroren.

2.3 Verwendete Inhibitoren

2.3.1 Inhibitor-Cocktail

Um unerwünschten Druckreaktionen durch Abbauprodukte der Arachidonsäure, durch PAF oder Histamin infolge der Degranulation von Mastzellen vorzubeugen, wurde jeweils vor Beginn der steady-state-Phase ein Inhibitor-Cocktail dem Perfusat beigemischt [82,84,111,112,113]. Diese Vorgehensweise hat sich in vorausgegangenen Arbeiten zur Stabilisierung der Lunge bewährt.

Der Inhibitor-Cocktail setzte sich aus folgenden vier Inhaltsstoffen zusammen:

2.3.1.1 Voltaren®

Wirkstoff: Diclofenac-Natrium

Stoffgruppe: Nichtsteroidale Antiphlogistika

Zusammensetzung: 1 Ampulle mit 3 ml Injektionslösung enthält 75 mg

Gebrauchslösung: 0,4 ml Voltaren® + 9,6 ml NaCl-Lösung = 1 mg/ml Diclofenac

Darreichungsform: 1 ml Gebrauchslösung pro 100 ml Perfusat

Endkonzentration: 10 µg pro ml Perfusat

Pharmazeutisches Unternehmen: Novartis Pharma AG, Wehr

2.3.1.2 WEB 2086

Chemische Bezeichnung: 3-[4-(2-Chlorphenyl)-9-methyl-6H-thienol[3,2-f][1,2,4]triazolo-[4,3-a] [1,4]-diazepin-2-yl]-1-(4-morpholinyl)-1-propanon

Summenformel: $C_{22}H_{22}ClN_5O_2S$

Molekulargewicht: 455,9 Dalton

Löslichkeit: 0,36 % in H_2O (pH = 6)

Biologische Wirkung: PAF - Antagonist

Dosierung am Kaninchenmodell: $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l

1 ml Stocklösung 10^{-2} mol pro 200 ml Perfusat

Endkonzentration: $100 \mu m = 10^{-4}$ M

WEB 2086 ist ein Triazolodiazepin, es ist ein potenter und spezifischer PAF - Antagonist in vitro und in vivo. Bei Vorbehandlung mit WEB 2086 wird dosisabhängig die Akkumulation und Aggregation von 111 Indium beladenen Zellen, die Bronchokonstriktion und die systemische Hypotension inhibiert [26].

2.3.1.3 Fenistil®

Wirkstoff: Dimetindenmaleat

Stoffgruppe: Histamin - H1 - Rezeptorantagonist

Zusammensetzung: Die zubereitete Lösung enthält 4 mg Dimetindenmaleat in 4 ml

Darreichungsform: 0,25 ml pro 200 ml Perfusat = 0,25 mg pro 100 ml

Pharmazeutisches Unternehmen: Zyma GmbH, München

2.3.1.4 Pepdul®

Wirkstoff: Famotidin

Stoffgruppe: Histamin - H2 - Rezeptorantagonist

Zusammensetzung: Die zubereitete Lösung enthält 20 mg Famotidin in 5 ml

Darreichungsform: 0,25 ml pro 200 ml Perfusat = 0,5 mg pro 100 ml

Pharmazeutisches Unternehmen: MSD Cipropharm GmbH, 85530 Haar

2.3.2 Calpaininhibitoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Calpain I -Inhibitoren wurden mit freundlicher Genehmigung der Firma Abbott GmbH & Co. KG, Ludwigshafen zur Verfügung gestellt. Nach Lubisch et al. [80] handelt es sich um neuartige von Benzoyl-alanin abgeleitete Ketoamide, welche Vinylbenzylaminoreste in der P²/P³ Region tragen und Calpaine in nanomolarer Konzentration inhibieren (siehe Ki-Werte). Die Inhibitoren verfügen über eine gute Wasserlöslichkeit, Zell-permeabilität, metabolische Stabilität und orale Bioverfügbarkeit.

Verwendet wurden die Calpaininhibitoren A-705239 und A-705253.

BSF	A-	Calpain I Ki (nM)	Cathepsin B Ki (nM)	Cathepsin L Ki (nM)	Proteosom Ki (nM)
409425	705239	13	27	22	400000
419961	705253	27	62	149	26000

2.4 Versuchsdurchführung

Am Ende der 15-minütigen Flowsteigerung wurde ein Inhibitor-Cocktail, (siehe 2.3.1) bestehend aus WEB 2086 (10^{-4} mol/l), Diclofenac (10 µg/ml), Pepdul® (10^{-5} mol/l) und Fenistil® (10^{-5} mol/l), in das zirkulierende System, vor den Pall-Filter und die Blasenfalle gegeben.

Nachdem das Lungenpräparat eine steady-state-Phase von 15 min stabil durchlaufen hatte, wurde zu einem definierten Zeitpunkt ($t = 0$) die zu untersuchende Substanz (A-705239, A-705253) in einer Endkonzentration von 10^{-8} mol/l injiziert. Es wurden jeweils $n = 6$ Versuche durchgeführt.

Nach weiteren 10 min wurde eine Suspension aus frisch isolierten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten ($250-300 \cdot 10^6$), 200 mg IgG* und 8 ml KHHP, direkt in den Perfusionskatheter des Truncus pulmonalis injiziert.

In weiteren 10 Versuchen wurden IgG*-aktivierte PMN in Abwesenheit von Proteinaseinhibitoren injiziert, sie dienten als Kontrollversuche.

Alle Versuche wurden über einen Zeitraum von 180 min durchgeführt.

Während des gesamten Versuches wurden fortlaufend über einen 6-Kanal-Kompensationsschreiber (R-10 Series, Rikadenki, Freiburg, Tokyo, Japan) der pulmonalarterielle Druck (PAP) und die Lungengewichtszunahme, als Indikator für extravaskuläres Lungenwasser, dokumentiert und zu festgelegten Zeitpunkten Perfusatproben (A-H) entnommen, die zur Kontrolle des pH, pO_2 , pCO_2 , BE, Standardbikarbonats und für spätere laborchemische Bestimmungen (PMN-Elastase und Histamin) dienten.

Nach einer Zentrifugationsdauer von 10 min bei 1000 g und Raumtemperatur wurde der Überstand der Perfusatproben abpipettiert und bei -20 °C eingefroren. Diese Proben standen für spätere Analysen zur Verfügung.

2.5 Laborchemische Analyse

2.5.1 *Quantitative Bestimmung der PMN-Elastase*

Zur Bestimmung der PMN-Elastase wurde ein heterogener Enzymimmunoassay (PMN-Elastase-Kit, Best.-Nr. 12589, Fa. Merck, Darmstadt) verwendet. Mittels des verwendeten Kits lässt sich die PMN-Elastase im Komplex mit α_1 -PI im Plasma nachweisen.

Als erstes wurde die zu bestimmende Probe unter Zusatz des humanen α_1 -Proteaseninhibitors (Endkonzentration 12,5 mg/ml) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei verband sich die vorhandene Elastase mit dem α_1 -Proteaseninhibitor. Anschließend wurde die vorbehandelte Probe in mit Elastase-Antikörper beschichtete Röhrchen gefüllt und so die PMN-Elastasen-inhibitor-Komplexe randständig gebunden.

Zunächst wurden verschiedene Ansätze vorbereitet, 1 Kontrollwert, 4 Kalibratoren unterschiedlicher Konzentration, 1 Reagenzienkontrollwert und die zu bestimmende Probe. Bevor diese unterschiedlichen Reagenzien in die Röhrchen eingebracht werden konnten, wurden die antikörperbeschichteten Röhrchen mit „Waschlösung“ gefüllt und nach 60-minütiger Inkubationszeit bei 20-25 °C diese vollständig abgesaugt. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt. Im Anschluss daran wurden Antikörper zugesetzt, die mit alkalischer Phosphatase markiert waren und mit der α_1 -PI-Komponente des Komplexes reagierten.

Nach Auswaschen der überschüssigen AP-markierten Antikörper und Abstoppen der Reaktion mit Natronlauge wurde die enzymatische Aktivität der über Immunkomplexe gebundenen alkalischen Phosphatase photometrisch bestimmt. Die Menge an gebildetem Farbstoff entsprach direkt proportional der Konzentration an PMN-Elastase im Ausgangsreagenz. Jede Probe wurde doppelt analysiert und daraus der Mittelwert gebildet.

3 STATISTIK

3.1 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programmes „*Statgraphics-Plus®*“ (Statistical Graphics Corporation, Rockville, Maryland, USA).

Zunächst wurde die Normalverteilung der Ergebnisse mittels t-Test geprüft. Danach wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) und der multiple Vergleichstest nach Fisher durchgeführt. Alle Resultate wurden in Mittelwerten (Mean) \pm mittlerer Standardabweichung (Standard Error of Mean = S.E.M.) angegeben.

Signifikanz wurde angenommen, wenn sich *P*-Werte kleiner oder gleich 0.05 ergaben.

4 ERGEBNISSE

4.1 Zunahme des Lungengewichtes (Ödembildung)

Nach Injektion von PMN ($250-300 \cdot 10^6$) und hitzedenaturierten Immunglobulinen (200 mg) in die pulmonale Zirkulation (PMN + IgG* = Kontrolle), zeigten die Lungen in der nichtinhibierten Kontrollgruppe eine kontinuierliche Gewichtszunahme auf $35,4 \text{ g} \pm 19,3 \text{ g}$ bis zum Ende des 180-minütigen Versuches.

Im Kontrollkollektiv ohne Calpaininhibitoren kam es im Versuchsverlauf zu einer Gewichtszunahme, die sich zum Versuchsende hin immer stärker steigerte. Am Versuchsende nach 180 min konnte durch die im Versuchsverlauf eingelagerte Flüssigkeit ein Lungengewichtsanstieg von 28,05 g registriert werden (Abb. 1).

In der Versuchsreihe unter Zugabe des Calpaininhibitors A-705239 zeigte sich ebenfalls eine Flüssigkeitseinlagerung, die jedoch deutlich geringer als im Kontrollkollektiv ausfiel. Am Ende der 180 min wurde eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 11 g registriert. Dies entspricht einer hochsignifikanten Gewichtsreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine noch stärkere Reduktion des Lungengewichtes wird von der Versuchsreihe unter Zugabe des Calpain Inhibitors A-705253 erreicht. Hier kommt es lediglich zu einem Lungengewichtsanstieg von 4,58 g über die Versuchsdauer von 180 min.

Beide Inhibitoren zeigen eine hochsignifikante Hemmung der Ödementwicklung am Modell der isoliert, ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge, wobei sich A-705253 als potentester Inhibitor auszeichnet.

In vorhergehenden Arbeiten zeigte sich, dass die alleinige Gabe von Immunglobulinen ohne PMN und Inhibitoren (IgG* - Kontrollen) keine Lungenschädigung verursachte.

4.2 Pulmonalarterieller Druck

Das Verhalten des Pulmonalarteriendruckes zeigte in den verschiedenen Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede. Der Ausgangsdruck lag zwischen 5 und 8 mmHg und stieg nach PMN - Applikation auf Werte zwischen 8 und 12 mmHg an. Auf die Versuchsdauer von 180 min blieben die Drücke aller Versuchsreihen auf gleichem Niveau ohne Druckveränderungen über die Zeit, im Streubereich zwischen 5,58 und 14,11 mmHg (Abb. 2).

Der Filtrationsdruck blieb unverändert, die Messung erfolgte bei konstanten Perfusionsdrücken.

4.3 Freisetzung der PMN-Elastase

Im Gegensatz zur nichtinhibierten Kontrolle, bei der es zu einer starken Freisetzung der Elastase im Versuchsverlauf bis 97,8 µg pro l nach 150 min kommt, ist die Elastaseliberation in den inhibierten Gruppen signifikant reduziert.

In der Versuchsgruppe Calpaininhibitor A-705239, kommt es nach 150 min zu einem freigesetzten Wert der Elastase von 57,25 µg pro l, bei der Versuchsgruppe mit Calpaininhibitor A-705253 nur zu 44,88 µg pro l.

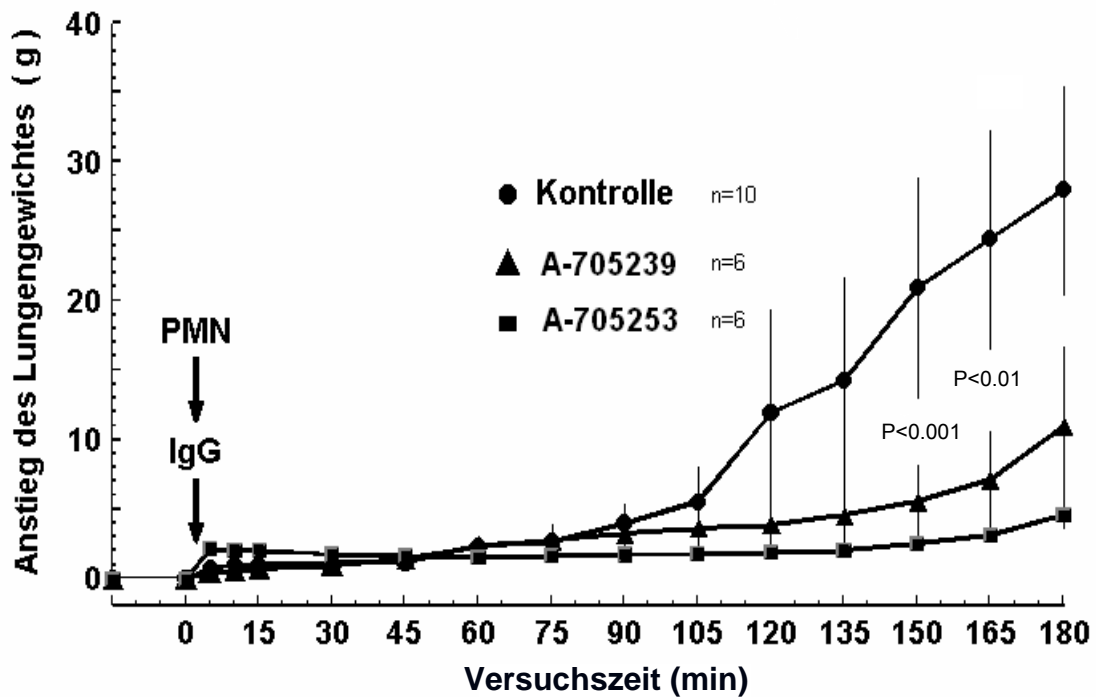
Die Calpaininhibitoren erweisen sich in diesen Versuchen als Inhibitoren der Elastasefreisetzung, wobei A-705253 in seiner Wirkung potenter ist als A-705239.

4.4 Freisetzung von Histamin

Am Versuchsbeginn zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Histaminfreisetzung in allen Versuchsgruppen gleich stark ausgeprägt und beginnt anzusteigen.

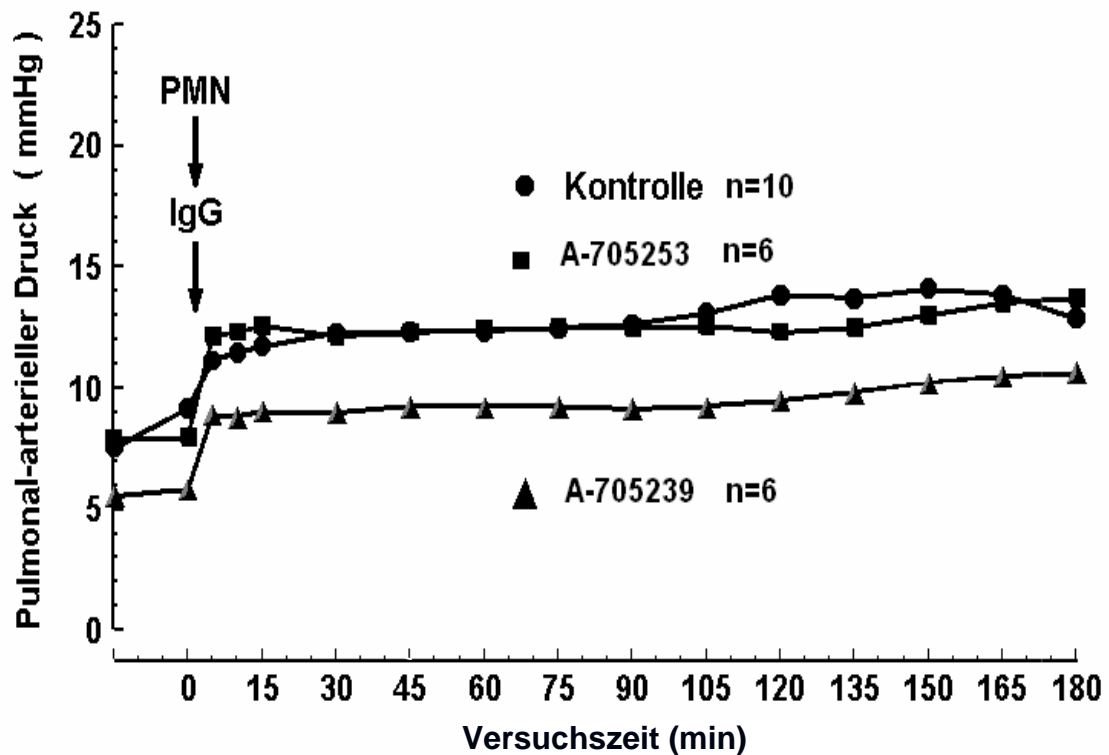
In der Kontrollgruppe ohne Inhibitoren kommt es im Versuchsverlauf zur ungehemmten Histaminfreisetzung von 240 mmol/l nach 5 Minuten und einem maximalen Wert von 310 mmol/l nach 30 min. Die Histaminliberation wird in den mit Calpaininhibitoren behandelten Gruppen stark reduziert, wobei die Versuchsgruppe mit A-705253 Histamin noch stärker inhibiert als die Versuchsgruppe mit A-705239. Als maximalen Wert bei A-705239 werden 240 mmol/l nach 5 min erreicht, danach fällt die Histaminfreisetzung bis auf einen Wert von 190 mmol/l stark ab. Der Höchstwert der bei der Versuchsreihe mit A-705253 erreicht wird, liegt bei lediglich 150 mmol/l nach 5 min.

4.5 Abbildung 1



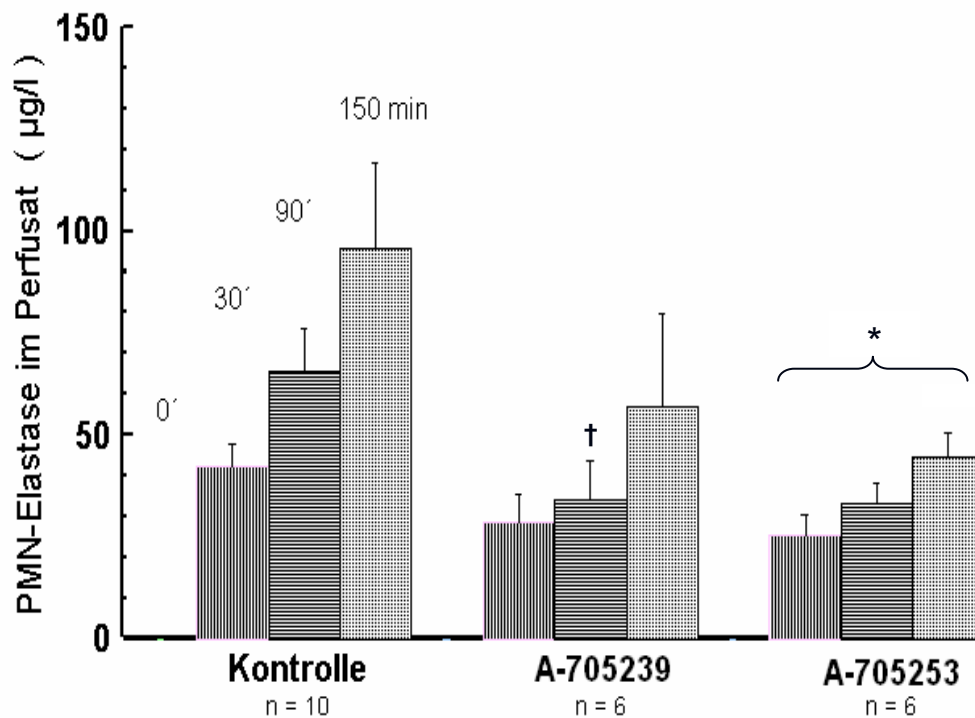
Zunahme des Lungengewichtes in g, in der Zeit von 0 bis 180 min. Dargestellt sind die Kurvenverläufe der nicht-inhibierten Kontrollgruppe und der mit A-705239 und A-705253 behandelten Calpaininhibitorgruppen mit Standard Error of Mean (S.E.M.). Die Endkonzentration der Inhibitoren beträgt in beiden inhibierten Gruppen 10^{-8} M. Die Kontrollgruppe unterscheidet sich signifikant mit $p<0.01$ von der Behandlungsgruppe A-705239 und mit $p<0.001$ von der Behandlungsgruppe A-705253.

4.6 Abbildung 2



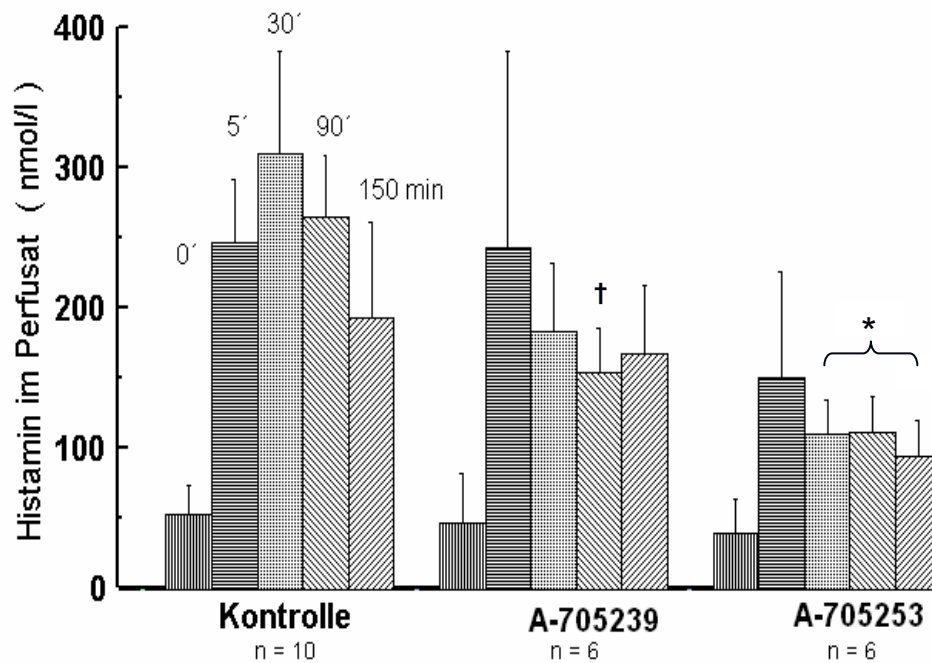
Darstellung des pulmonalarteriellen Druckes (Perfusionsdruck, in mmHg) in isolierten, perfundierten Kaninchenlungen nach intrapulmonaler Injektion von humanen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten ($t = 0$), welche intravasal durch hitzedenaturiertes IgG vorstimuliert wurden. In allen Versuchsgruppen (Calpainversuche jeweils $n = 6$, Kontrollgruppe $n = 10$) blieb der Perfusionsdruck über eine Versuchszeit von 180 min konstant.

4.7 Abbildung 3



Anstieg der PMN-Elastase-Konzentration in der Perfusionsflüssigkeit (in $\mu\text{g/l}$) isolierter, perfundierter Kaninchenlungen nach intrapulmonaler Injektion von humanen PMN, welche intravasal durch hitzedenaturierte Immunglobuline (IgG^*) vorstimuliert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte der verschiedenen Versuchsreihen mit S.E.M. zu den Zeitpunkten $t = 0$, $t = 30$, $t = 90$, $t = 150$ (in min). Signifikante Ergebnisse ($p < 0.05$) wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Gruppe $^* \text{A-705239}$ zum Zeitpunkt 90 min und $^\dagger \text{A-705253}$ zu den Zeitpunkten 30, 90 und 150 min erreicht.

4.8 Abbildung 4



Freisetzung von Histamin in die Perfusionsflüssigkeit (in mmol/l) isoliert perfundierter Kaninchenlungen nach intrapulmonaler Injektion von humanen PMN ($t = 0$), welche intravasal durch hitzedenaturierte Immunglobuline (IgG*) vorstimuliert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte der 3 Versuchsreihen zu den Zeitpunkten $t = 0$, $t = 5$, $t = 30$, $t = 90$ und $t = 150$ (in min) mit S.E.M. Signifikanz wurde bei $p < 0.05$ angenommen. Aufgetragen sind die Signifikanzen von *A-705239 und †A-705253 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

5 DISKUSSION

Bei Erkrankungen, wie der Sepsis, der postischämischen Reperfusion oder dem polytraumatisierten Patienten, kommt es zur Adhärenz und Aktivierung von Leukozyten in der Lungenstrombahn. Dies betrifft im Speziellen polymorphkernige neutrophile Granulozyten, die nach ihrer Aktivierung Mediatoren freisetzen, welche die Entwicklung eines interstitiellen Lungenödems aufgrund einer Zunahme der Gefäßpermeabilität verursachen. Dies führt sekundär von der Dysfunktion bis hin zum Versagen zuvor gesunder Lungen. Hierbei sind lysosomale Proteasen, wie die Elastase, aber auch reaktive Sauerstoffradikale, ein wesentlicher Bestandteil in der multifaktoriellen Pathogenese des ARDS [98,107].

Die Freisetzung lysosomaler Elastase aus den injizierten und aktivierten PMN in die Perfusionslösung der isoliert ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge wird durch die Ergebnisse dieser Studie belegt. Aus früheren Arbeiten, wie zum Beispiel von Ermert, Seeger und Duncker, ist durch quantitative Bestimmungen bereits bekannt, dass eine große Anzahl von Leukozyten, im wesentlichen polymorphkernige neutrophile Granulozyten, sowohl intravasal in den Lungenkapillaren, als auch in den Alveolen festsitzen. So ist davon auszugehen, dass sich zu Versuchsbeginn ein intravasaler Pool von ca. $14 \cdot 10^8$ und nach drei Stunden blutfreier Perfusion immer noch $7 \cdot 10^8$ Granulozyten im Kapillarbereich der Lungen befinden [35,46,47].

Um Einflüsse dieser vorhandenen PMN auf die geplanten Versuche zu untersuchen und um aussagekräftige Ergebnisse erzielen zu können, wurden Vorversuche durchgeführt, ohne dass den Versuchen stimulierte PMN oder Proteaseinhibitoren beigegeben wurden. In diesen Vorversuchen zeigte sich, bei einer Versuchsdauer von 180 min nur ein geringer Anstieg des Lungengewichts bis zu 5 g, sodass man davon ausgehen kann, dass die im Kapillarbett trotz Spülung vorhandenen restlichen PMN keine Effekte auf die durchgeführten Versuche zeigten, da im Rahmen der Spülung vor der Flowsteigerung die von diesen PMN freigesetzte Elastase bereits ausgespült wurde.

Die Vorstimulation polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten mit hitzeaggregierten IgG* und die Applikation der stimulierten Zellen in das Perfusionsmedium isolierter, ventilerter und perfundierter Kaninchenlungen, via Arteria pulmonalis, führte zu einem hochsignifikanten Gewichtsanstieg dieser Lungen als Ausdruck einer gesteigerten Gefäßpermeabilität während der Versuchsdauer von 180 min.

Die Nutzung hitzedenaturierter IgG zur PMN Aktivierung ist vergleichbaren wasserlöslichen Agenzien überlegen, da nur intravasale PMN stimuliert werden.

Das Lungenödem, das sich als Ausdruck der pulmonalen Gewichtszunahme entwickelte, entstand im Versuchsverlauf simultan mit der Zunahme der Elastasekonzentration im Perfusionsmedium in der nicht-inhibierten Kontrollgruppe. Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit Experimenten von Koch [76] an isolierten Kaninchenlungen und den Schweineversuchen von Stokke [124], in denen die direkte Applikation von Pankreaselastase in die Lungenarterie zur Ödementwicklung führte.

Das entstandene Lungenödem ist in dieser Untersuchung auf die Erhöhung des kapillären Filtrationskoeffizienten (K_{fc}) zurückzuführen. In vergleichbaren Arbeiten konnte ein Anstieg des K_{fc} nach Applikation aktivierter PMN in die Lungenstrombahn isolierter, ventilerter und perfundierter Kaninchenlungen um das 2,5 fache ($0.94 \text{ ml} \cdot 100 \text{ g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{ mmHg}^{-1}$) vom Ausgangswert beobachtet werden.

Die prophylaktische Nutzung von Elastaseinhibitoren zur Vermeidung eines durch PMN-Elastase induzierten Lungenödems sowie der Gebrauch verschiedener menschlicher, tierischer und synthetischer Proteaseinhibitoren wurde an einem breiten Spektrum von Spezies und Versuchsmodellen getestet [41,58,85,88,116].

Jüngste Untersuchungen von C. Neuhof et al. [89] am Modell der isolierten, ventilerter und perfundierten Kaninchenlunge zeigten eine signifikante Reduktion der Elastasefreisetzung durch pflanzliche Proteaseinhibitoren vom Kunitz-Typ (zum Beispiel Bauhinia rufa Proteinaseinhibitor, BrPI oder Bauhinia bauginioides Kallikreininhibitor, BbCI). Die Wirkung dieser Inhibitoren ist mit der

des Eglin C aus dem Lurch *Hirudo medicinalis* bezüglich der Elastaseinhibition vergleichbar.

Im 180-minütigen Versuchsverlauf der hier vorliegenden Arbeit wurden zu definierten Zeitpunkten Perfusatproben entnommen und daraus ins Perfusat freigesetzte Elastase und Histamin bestimmt. Sowohl Elastase, als auch Histamin, das ebenfalls die Gefäßpermeabilität steigert, sind an der Entstehung des Lungenödems beteiligt und werden in der nicht-inhibierten Kontrollgruppe ungehemmt freigesetzt. Simultan zur Liberation dieser Mediatoren steigt das Lungengewicht als Ausdruck der Ödementwicklung im Versuchsverlauf auf 28,05 g an.

Im Gegensatz dazu kommt es in den Versuchsreihen unter Zugabe der Calpaininhibitoren zu einer hochsignifikant geringeren Gewichtszunahme (Abb. 1) sowie zu einer signifikanten Reduktion der Elastase- (Abb. 3) und der Histaminliberation (Abb. 4).

Fasst man die oben genannten Argumente zusammen, so entsteht die begründete Annahme, dass nach PMN-Stimulation liberierte Elastase und Histamin eine pulmonale Permeabilitätsstörung als nicht hämodynamisch bedingte Flüssigkeitseinlagerung der Lungenstrombahn induzieren. Dieser Eindruck wird durch die Konstanz und Stabilität des pulmonalarteriellen Druckes über die gesamte Versuchsdauer (Abb. 2) untermauert.

Als Ergebnis zeigt sich eindeutig, dass die Calpaininhibitoren die Flüssigkeitseinlagerung in der Lunge, die Elastase- sowie die Histaminfreisetzung signifikant reduzieren. Dabei erweist sich A-705253 als ein potenterer Inhibitor als A-705239.

Die Wirksamkeit der Calpaininhibitoren und die Potenz, mit der sie die Ödembildung reduzieren, lässt auf eine weitreichende Beteiligung der Calpaine an der Entstehung eines Lungenödems und den vielen ineinander greifenden Pathomechanismen schließen. Inwieweit Calpaine an der Entwicklung eines Lungenödems beteiligt sind und dies durch ihre Inhibitoren verhindert werden kann, lässt sich durch die hemmende Wirkung, die die Calpaininhibitoren auch auf Elastase und Histamin zeigen, nicht spezifisch belegen.

Weiterführende Untersuchungen an isolierten Zellen oder Blutproben, bei denen zusätzlich zu den Calpaininhibitoren auch Elastaseinhibitoren wie zum Beispiel Eglin C zugegeben werden, um die Elastasefreisetzung und ihre dadurch resultierenden Wirkungen zu unterdrücken, werden in der Zukunft zeigen, welche spezifischen Wirkungen Calpain und seine Inhibitoren neben den oben genannten Wirkungen haben.

Diese Untersuchungen sind erforderlich, um die isolierte Wirkung von Calpain an der Entstehung des Lungenödems beurteilen zu können.

Ein weiterer Versuchsansatz könnte durch Ischämie beziehungsweise Hypoxie der Lungen geschaffen werden. Diese Untersuchungen könnten zeigen, inwieweit eine Hypoxie, auch wenn sie nur kurzfristig, wie unter den Bedingungen einer kardiopulmonalen Reanimation, auftritt, die Lunge durch Calpainfreisetzung schädigt und ob diese Noxe durch Calpaininhibitoren unterdrückt werden kann. Ischämie- und hypoxiebedingte Organschäden durch Calpainfreisetzung sind zum Beispiel an Herz und Gehirn weitreichend beschrieben worden [67,102,132] und bieten ein weites Feld für zukünftige Untersuchungen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss von Calpaininhibitoren auf die Ca^{2+} -abhängige Protease Calpain I sowie deren Einfluss auf die Störung der pulmonalvaskulären Permeabilität nach intravasaler Aktivierung von Granulozyten zu untersuchen. Die hierfür operativ isolierten Kaninchenlungen wurden mit einem Krebs-Henseleit-Hydroxyäthylstärke-Puffer, bei einem Flow von 200 ml/min perfundiert und mit einer Starling-Pumpe ventiliert. Mittels einer elektronischen Wägezelle wurden Veränderungen des Lungengewichtes aufgezeichnet, um damit pulmonalvaskuläre Permeabilitätsstörungen zu erfassen. Nach Einbringen eines Pulmonalkatheters war es möglich, Veränderungen im Lungengefäßwiderstand in Form des pulmonalarteriellen Druckes zu registrieren. Durch Percoll-Dichtegradientenzentrifugation wurden humane Granulozyten isoliert und nach einer steady-state-Phase von 15 min am Versuchsbeginn zum Zeitpunkt $t = 0$ injiziert. Die Granulozyten waren zuvor für die Dauer von 60 min bei Raumtemperatur mit hitzeaggregiertem Immunglobulin G (IgG^*) als Stimulus inkubiert worden. Pro Versuch wurden zwischen 250 und $300 \cdot 10^6$ Granulozyten appliziert.

Etwa 60 min nach Injektion der vorstimulierten PMN in die pulmonale Zirkulation entwickelte sich in der nicht-inhibierten Kontrollgruppe ein Lungengewichtsanstieg als Ausdruck eines interstitiellen Lungenödems. Im Versuchsverlauf wurden aus dem Perfusat zu definierten Zeitpunkten Proben entnommen, aus denen die Konzentration von PMN-Elastase und Histamin bestimmt wurde (Abb. 3 und 4). Bei gleichbleibendem pulmonalarteriellen Druck (Abb. 2) stiegen in der nicht-inhibierten Kontrollgruppe die Werte von PMN-Elastase, Histamin und Lungengewicht an (Abb. 1). Diese Zunahme des Lungengewichtes ist aufgrund des konstanten PAP-Wertes kein Ausdruck eines erhöhten Filtrationsdruckes, sondern vielmehr auf die Freisetzung von Proteasen und deren Wirkung auf die pulmonale Strombahn zurückzuführen.

Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Versuchsablauf, wie er für die nicht-inhibierte Kontrollgruppe typisch ist, zeigte sich in den Versuchsreihen unter Zugabe der Calpaininhibitoren A-705239 und A-705253 eine hochsignifikante

Reduktion sowohl der Lungengewichtszunahme als auch der Elastase- und Histaminfreisetzung. Beide Calpaininhibitoren sind in der Lage, die Entwicklung eines Lungenödems stark zu verlangsamen sowie die Elastase- und Histaminfreisetzung zu reduzieren. Hieraus lassen sich Ansatzpunkte für weitere zukünftige Untersuchungen finden. Durch weitere Studien an isolierten Zellen oder Blutproben lassen sich unter Zugabe von spezifischen Elastaseinhibitoren und Calpaininhibitoren neue Erkenntnisse darüber erlangen, wie spezifisch diese die Elastasefreisetzung blockieren, sich als Histamin-Antagonisten bewähren und welche Effekte nur auf Calpaine zurückzuführen sind.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abboud RT, Fera T, Richter A, Tabona MZ, Johal S

Acute effect of smoking on the functional activity of alpha1-proteaseinhibitor in bronchoalveolar lavage fluid.

Am Rev Respir Dis 1985 ; 131 : 79-85

2. Baici A, Seemüller U

Kinetics of the inhibition of human leucocyte elastase by eglin from the leech *Hirudo medicinalis*.

Biochem J 1984; 218 : 829-833

3. Baird BR, Cheronis JC, Sandhaus RA, Berger EM, White CW, RepineJE

O₂ metabolites and neutrophil elastase synergistically cause edematous injury in isolated rat lungs.

J Appl Physiol 1986; 61 : 2224-2229

4. Banik NL, Matzelle D, Terry E, Hogan EL

A new mechanism of methylprednisolone and other corticosteroids action demonstrated in vitro: inhibition of a proteinase (calpain) prevents myelin and cytoskeletal protein degradation.

Brain Res 1997; 748 : 205-210

5. Barnoy S, Glaser T, Kosower NS

Calpain and calpastatin in myoblast differentiation and fusion: effects of inhibitors.

Biochem Biophys Acta 1997; 1358 : 181-188

6. Barrett MJ, Goll DE, Thompson VF

Effect of substrate on Ca²⁺(+)-concentration required for activity of the Ca²⁺(+)-dependent proteinases, mu- and m-calpain.

Life Sci 1991; 48 : 1659-1669

7. Belcastro AN, Shewchuk LD, Raj DA

Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis.

Mol Cell Biochem 1998; 179 : 135-145

8. Belles B, Hescheler J, Trautwein W, Blomgren K, Karlsson JO

A possible physiological role of the Ca-dependent protease calpain and its inhibitor calpastatin on the Ca current in guinea pig myocytes.

Pflügers Arch 1988; 412 : 554-556

9. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, LeGall JR, Morris A, Spragg R

The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination.

Am J Respir Crit Care Med 1994; 149 : 818-824

10. Bernard GR, Brigham KL

The adult respiratory distress syndrome.

Annu Rev Med 1985; 36 : 195-205

11. Bernard GR, Brigham KL

Noncardiac pulmonary edema

Compr Ther 1986; 12 : 64-69

12. Bernard GR, Brigham KL

Pulmonary edema. Pathophysiologic mechanisms and new approaches to therapy.

Chest 1986; 89 : 594-600

13. Betzel C, Dauter Z, Genov N, Lamzin V, Navaza J, Schnebli HP, Visanji M, Wilson KS

Structure of the proteinase inhibitor eglin c with hydrolysed reactive centre at 2.0 Å resolution.

FEBS Lett 1993; 317 : 185-188

14. Bieth JG

Human leukocyte elastase.

Pathol Biol (Paris) 1988; 36 : 1108-1111

15. Blondin J, Janoff A

The role of lysosomal elastase in the digestion of *Escherichia coli* proteins by human polymorphonuclear leukocytes: experiments with living leukocytes.

J Clin Invest 1976; 58 : 971-979

16. Boyd JE, Bewman JH, Brigham KL

Permeability pulmonary edema. Diagnosis and management.

Arch Intern Med 1984; 144 : 143-147

17. Braun NJ, Bodmer JL, Virca GD, Metz-Virca G, Maschler R, Bieth JG, Schnebli HP

Kinetic studies on the interaction of eglin c with human leukocyte elastase and cathepsin G.

Biol Chem Hoppe Seyler 1987; 368 : 299-308

18. Braun NJ, Schnebli HP

A brief review of the biochemistry and pharmacology of Eglin c, an elastase inhibitor.

Eur J Respir Dis Suppl 1986; 146 : 541-547

19. Brigham KL

Mechanisms of lung injury.

Clin Chest Med 1982; 3 : 9-24

20. Brigham KL

Role of free radicals in lung injury.

Chest 1986; 89 : 859-863

21. Brigham KL

Oxidant stress and adult respiratory distress syndrome.

Eur Respir J Suppl 1990; 11 : 482s-484s

22. Brigham KL

Oxygen radicals--an important mediator of sepsis and septic shock.

Klin Wochenschr 1991; 69 : 1004-1008

23. Brigham KL, Begley CJ, Bernard GR, Hutchison AA, Loyd JE, Lucht WD, Meyrick B, Newman JH, Niedermeyer ME, Ogletree ML

Septicemia and lung injury.

Clin Lab Med 1983; 3 : 719-744

24. Brower RG, Ware LB, Berthiaume Y, Matthay MA

Treatment of ARDS.

Chest 2001; 120 : 1347-1367

25. Carl VS, Moore EE, Moore FA, Whalley ET

Involvement of bradykinin B1 and B2 receptors in human PMN elastase release and increase in endothelial cell monolayer permeability.

Immunopharm 1996; 33 : 325-329

26. Casals-Stenzel J, Muacevic G, Weber KH

Pharmacological actions of WEB 2086, a new specific antagonist of platelet activating factor.

J Pharmacol Exp Ther 1987; 241 : 974-981

27. Casolaro MA, Fells G, Wewers M, Pierce JE, Ogushi F, Hubbard R, Sellers S, Forstrom J, Lyons D, Kawasaki G

Augmentation of lung antineutrophil elastase capacity with recombinant human alpha-1-antitrypsin.

J Appl Physiol 1987; 63 : 2015-2023

28. Cavarra E, Martorana PA, Gambelli F, de Santi M, van Even P, Lungarella G

Neutrophil recruitment into the lungs is associated with increased lung elastase burden, decreased lung elastin, and emphysema in alpha 1 proteinase inhibitor-deficient mice.

Lab Invest 1996; 75 : 273-280

29. Chatterjee S, Ator MA, Bozyczko-Coyne D, Josef K, Wells G, Tripathy R, Iqbal M, Bihovsky R, Senadhi SE, Mallya S, O'Kane TM, McKenna BA, Siman R, Mallamo JP

Synthesis and biological activity of a series of potent fluoromethyl ketone inhibitors of recombinant human calpain I.

J Med Chem 1997; 40 : 3820-3828

30. Chatterjee S, Iqbal M, Mallya S, Senadhi SE, O'Kane TM, McKenna BA, Bozyczko-Coyne D, Kauer JC, Siman R, Mallamo JP

Exploration of the importance of the P2-P3-NHCO-moiety in a potent di- or tripeptide inhibitor of calpain I: insights into the development of nonpeptidic inhibitors of calpain I.

Bioorg Med Chem 1998; 6 : 509-522

31. Chen ZF, Schottler F, Lee KS

Neuronal recovery after moderate hypoxia is improved by the calpain inhibitor MDL28170.

Brain Res 1997; 769 : 188-192

32. Chian CF, Chang FY

Acute respiratory distress syndrome in *Mycoplasma pneumoniae*: a case report and review.

J Microbiol Immunol Infect 1999; 32 : 52-56

33. Chignard M, Balloy V, Renesto P

Leucocyte elastase-mediated release of von Willebrand factor from cultured endothelial cells.

Eur Respir J 1993; 6 : 791-796

34. Cochrane CG, Spragg R, Revak SD

Pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome. Evidence of oxidant activity in bronchoalveolar lavage fluid.

J Clin Invest 1983; 71:754-761

35. Cohen AB, Batra G, Petersen R, Podany J, Nguyen D

Size of the pool of alveolar neutrophils in normal rabbit lungs.

J Appl Physiol 1979; 47 : 440-444

36. Cong J, Goll DE, Peterson AM, Kapprell HP

The role of autolysis in activity of the Ca²⁺-dependent proteinases (mu-calpain and m-calpain).

J Biol Chem 1989; 264 : 10096-10103

37. Connelly KG, Moss M, Parsons PE, Moore EE, Moore FA, Giclas PC, Seligman PA, Repine JE

Serum ferritin as a predictor of the acute respiratory distress syndrome.

Am J Respir Crit Care Med 1997; 155 : 21-25

38. Cottin P, Poussard S, Desmazes JP, Georgescauld D, Ducastaing A

Free calcium and calpain I activity.

Biochem Biophys Acta 1991; 1079 : 139-145

39. Dean RT, Nick HP, Schnebli HP

Free radicals inactivate human neutrophil elastase and its inhibitors with comparable efficiency.

Biochem Biophys Res Commun 1989; 159 : 821-827

40. Deby-Dupont G, Haas M, Pincemail J, Braun M, Lamy M, Deby C, Franchimont P

Immunoreactive trypsin in the adult respiratory distress syndrome.

Intensive Care Med 1984; 10 : 7-12

41. Delacourt C, Herigault S, Delclaux C, Poncin A, Levame M, Harf A, Saudubray F, Lafuma C

Protection against acute lung injury by intravenous or intratracheal pretreatment with EPI-HNE-4, a new potent neutrophil elastase inhibitor.

Am J Respir Cell Mol Biol 2002; 26 : 290-297

42. Diaz J, Tornel PL, Jara P, Canizares F, Egea JM, Martinez P

The value of polymorphonuclear elastase in adult respiratory distress syndrome.

Clin Chim Acta 1995; 236 : 119-127

43. Dittmer H, Jochum M, Schmit-Neuerburg KP

[The PMN elastase plasma level, a biochemical parameter of the severity of trauma].

Chirurg 1985; 56 : 723-727

44. Donnelly SC, MacGregor I, Zamani A, Gordon MW, Robertson CE, Steedman DJ, Little K, Haslett C

Plasma elastase levels and the development of the adult respiratory distress syndrome.

Am J Respir Crit Care Med 1995; 151 : 1428-1433

45. Douzinas EE, Tsidemiadou PD, Pitaridis MT, Andrianakis I, Bobota-Chloraki A, Katsouyanni K, Sfyras D, Malagari K, Roussos C

The regional production of cytokines and lactate in sepsis-related multiple organ failure.

Am J Respir Crit Care Med 1997; 155 : 53-59

46. Ermert L, Duncker HR, Rosseau S, Schutte H, Seeger W

Morphometric analysis of pulmonary intracapillary leukocyte pools in ex vivo-perfused rabbit lungs.

Am J Physiol 1994; 267 : L64-L70

47. Ermert L, Seeger W, Duncker HR

Computer-assisted morphometry of the intracapillary leukocyte pool in the rabbit lung.

Cell Tissue Res 1993; 271 : 469-476

48. Esposito AL, Clark CA, Poirier WJ, Kephart PA

Protease inhibitor eglin-c affects superoxide anion release but not bacterial killing by human polymorphonuclear leukocytes.

Exp Lung Res 1988; 14 : 743-756

49. Fowler AA, Hamman RF, Good JT, Benson KN, Baird M, Eberle DJ, Petty TL, Hyers TM

Adult respiratory distress syndrome: risk with common predispositions.

Ann Intern Med 1983; 98 : 593-597

50. Fowler AA, Hamman RF, Zerbe GO, Benson KN, Hyers TM

Adult respiratory distress syndrome. Prognosis after onset.

Am Rev Respir Dis 1985 ; 132 : 472-478

51. Fowler AA, Hyers TM, Fisher BJ, Bechard DE, Centor RM, Webster RO

The adult respiratory distress syndrome. Cell populations and soluble mediators in the air spaces of patients at high risk.

Am Rev Respir Dis 1987; 136 : 1225-1231

52. Fox RB, Hoidal JR, Brown DM, Repine JE

Pulmonary inflammation due to oxygen toxicity: involvement of chemotactic factors and polymorphonuclear leukocytes.

Am Rev Respir Dis 1981 ; 123 : 521-523

53. Frank JA, Matthay MA

Science review: mechanisms of ventilator-induced injury.

Crit Care 2003; 7 : 233-241

54. Fujitani K, Kambayashi J, Sakon M, Ohmi SI, Kawashima S, Yukawa M, Yano Y, Miyoshi H, Ikeda M, Shinoki N, Monden M

Identification of mu-, m-calpains and calpastatin and capture of mu-calpain activation in endothelial cells.

J Cell Biochem 1997; 66 : 197-209

55. Fukusen N, Kato Y, Kido H, Katunuma N

Kinetic studies on the inhibitions of mast cell chymase by natural serine protease inhibitors: indications for potential biological functions of these inhibitors.

Biochem Med Metab Biol 1987; 38 : 165-169

56. Gadek JE, Pacht ER

The interdependence of lung antioxidants and antiprotease defense in ARDS.

Chest 1996; 110 : 273S-277S

57. Goll DE, Thompson VF, Taylor RG, Zalewska T

Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin?

Bioessays 1992; 14:549-556

58. Hagio T, Nakao S, Matsuoka H, Matsumoto S, Kawabata K, Ohno H

Inhibition of neutrophil elastase activity attenuates complement-mediated lung injury in the hamster.

Eur J Pharmacol 2001; 426 : 131-138

59. Hammerschmidt DE, Harris PD, Wayland JH, Craddock PR, Jacob HS

Complement-induced granulocyte aggregation in vivo.

Am J Pathol 1981; 102 : 146-150

60. Hammerschmidt DE, White JG, Craddock PR, Jacob HS

Corticosteroids inhibit complement-induced granulocyte aggregation. A possible mechanism for their efficacy in shock states.

J Clin Invest 1979; 63 : 798-803

61. Han YY, Sun WZ

An evidence-based review on the use of corticosteroids in peri-operative and critical care.

Acta Anaesthesiol Sin 2002; 40 : 71-79

62. Hirani N, Antonicelli F, Strieter RM, Wiesener MS, Ratcliffe PJ, Haslett C, Donnelly SC

The regulation of interleukin-8 by hypoxia in human macrophages - a potential role in the pathogenesis of the acute respiratory distress syndrome (ARDS).

Mol Med 2001; 7 : 685-697

63. Hjorth R, Jonsson AK, Vretblad P

A rapid method for purification of human granulocytes using percoll.

A comparison with dextran sedimentation.

J Immunol Methods 1981; 43 : 95-101

64. Holman RG, Maier RV

Superoxide production by neutrophils in a model of adult respiratory distress syndrome.

Arch Surg 1988; 123 : 1491-1495

65. Holter JF, Weiland JE, Pacht ER, Gadek JE, Davis WB

Protein permeability in the adult respiratory distress syndrome. Loss of size selectivity of the alveolar epithelium.

J Clin Invest 1986; 78 : 1513-1522

66. Huet-Duvillier G, Balduyck M, Watrigant Y, Sesboue R, Thiebaut C, Lafitte JJ, Degand P

Relationship between a mild alpha 1 proteinase inhibitor deficiency and respiratory symptoms in a family.

Ann Clin Biochem 1995; 32 (Pt 6) : 545-549

67. Iizuka K

[Role of calpain on hypoxic myocyte injury].

Hokkaido Igaku Zasshi 1994; 69 : 112-119

68. James T, Matzelle D, Bartus R, Hogan EL, Banik NL

New inhibitors of calpain prevent degradation of cytoskeletal and myelin proteins in spinal cord in vitro.

J Neurosci Res 1998; 51 : 218-222

69. Johnson P

Calpains (intracellular calcium-activated cysteine proteinases): structure-activity relationships and involvement in normal and abnormal cellular metabolism.

Int J Biochem 1990; 22 : 811-822

70. Junger WG, Hallstrom S, Redl H, Schlag G

Inhibition of human, ovine, and baboon neutrophil elastase with Eglin c and secretory leukocyte proteinase inhibitor.

Biol Chem Hoppe Seyler 1992; 373 : 119-122

71. Kakkar R, Raju RV, Mellgren RL, Radhi J, Sharma RK

Cardiac high molecular weight calmodulin binding protein contains calpastatin activity.

Biochemistry 1997; 36 : 11550-11555

72. Kapprell HP, Goll DE

Effect of Ca²⁺ on binding of the calpains to calpastatin.

J Biol Chem 1989; 264 : 17888-17896

73. Kawasaki H, Kawashima S

Regulation of the calpain-calpastatin system by membranes (review).

Mol Membr Biol 1996; 13 : 217-224

74. Kawashima S, Akanuma H, Asaoka K

Comparison of calpains from rabbit, monkey, human and rat.

Biol Chem 1998; 379 : 201-204

75. Kitagaki H, Tomioka S, Yoshizawa T, Sorimachi H, Saido TC, Ishiura S, Suzuki K

Autolysis of calpain large subunit inducing irreversible dissociation of stoichiometric heterodimer of calpain.

Biosci Biotechnol Biochem 2000; 64 : 689-695

76. Koch T, Duncker HP, Rosenkranz S, Neuhof H, Van Ackern K

Alterations of filtration coefficients in pulmonary edema of different pathogenesis.

J Appl Physiol 1992; 73 : 2396-2402

77. Kumar KV, Rao SM, Gayani R, Mohan IK, Naidu MU

Oxidant stress and essential fatty acids in patients with risk and established ARDS.

Clin Chim Acta 2000; 298 : 111-120

78. Lane RD, Allan DM, Mellgren RL

A comparison of the intracellular distribution of mu-calpain, m-calpain, and calpastatin in proliferating human A431 cells.

Exp Cell Res 1992; 203 : 5-16

79. Lewandowski K, Weimann J

Can lung protective ventilation methods modify outcome?--A critical review.

Anaesthesiol Reanim 2002; 27 : 124-130

80. Lubisch W, Beckenbach E, Bopp S, Hofmann HP, Kartal A, Kastel C, Lindner T, Metz-Garrecht M, Reeb J, Regner F, Vierling M, Möller A

Benzoylalanine-derived ketoamides carrying vinylbenzyl amino residues: discovery of potent water-soluble calpain inhibitors with oral bioavailability.

J Med Hem 2003; 46 : 2404-2412

81. Ma H, Yang HQ, Takano E, Hatanaka M, Maki M

Amino-terminal conserved region in proteinase inhibitor domain of calpastatin potentiates its calpain inhibitory activity by interacting with calmodulin-like domain of the proteinase.

J Biol Chem 1994; 269 : 24430-24436

82. Malik AB, Perlman MB, Cooper JA, Noonan T, Bizios R

Pulmonary microvascular effects of arachidonic acid metabolites and their role in lung vascular injury.

Fed Proc 1985; 44 : 36-42

83. Markgraf CG, Velayo NL, Johnson MP, McCarty DR, Medhi S, Koehl JR, Chmielewski PA, Linnik MD

Six-hour window of opportunity for calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats.

Stroke 1998; 29 : 152-158

84. Maugeri N, Evangelista V, Piccardoni P, Dell'Elba G, Celardo A, de Gaetano G, Cerletti C

Transcellular metabolism of arachidonic acid: increased platelet thromboxane generation in the presence of activated polymorphonuclear leukocytes.

Blood 1992; 80 : 447-451

85. Miyazaki Y, Inoue T, Kyi M, Sawada M, Miyake S, Yoshizawa Y

Effects of a neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) on acute pulmonary injury induced by tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) and activated neutrophils in isolated perfused rabbit lungs.

Am J Respir Crit Care Med 1998; 157 : 89-94

86. Morrison HM, Welgus HG, Stockley RA, Burnett D, Campbell EJ

Inhibition of human leukocyte elastase bound to elastin: relative ineffectiveness and two mechanisms of inhibitory activity.

Am J Respir Cell Mol Biol 1990; 2 : 263-269

87. Murachi T

Intracellular regulatory system involving calpain and calpastatin.

Biochem Int 1989; 18 : 263-294

88. Murata A, Toda H, Uda K, Hayashida H, Kato T, Nakagawa H, Yokoyama S, Morishita H, Yamakawa T, Hirose J

Protective effect of recombinant neutrophil elastase inhibitor (R-020) on sepsis-induced organ injury in rat.

Inflammation 1994; 18 : 337-347

89. Neuhof C, Oliva ML, Maybauer D, Maybauer M, de Oliveira C, Sampaio MU, Sampaio CA, Neuhof H

Effect of plant Kunitz inhibitors from Bauhinia bauhinioides and Bauhinia rufa on pulmonary edema caused by activated neutrophils.

Biol Chem 2003; 384 : 939-944

90. Neuhof H

Actions and interactions of mediator systems and mediators in the pathogenesis of ARDS and multiorgan failure.

Acta Anaesthesiol Scand Suppl 1991; 95 : 7-13

91. Neumann S, Hennrich N, Gunzer G, Lang H

Enzyme-linked immunoassay for human granulocyte elastase in complex with alpha 1-proteinase inhibitor.

Adv Exp Med Biol 1984; 167 : 379-390

92. Nieman G, Searles B, Carney D, McCann U, Schiller H, Lutz C, Finck C, Gatto LA, Hodell M, Picone A

Systemic inflammation induced by cardiopulmonary bypass: a review of pathogenesis and treatment.

J Extracorp Technol 1999; 31 : 202-210

93. Ognibene FP, Martin SE, Parker MM, Schlesinger T, Roach P, Burch C, Shelhamer JH, Parrillo JE

Adult respiratory distress syndrome in patients with severe neutropenia.

N Engl J Med 1996; 315 : 547-551

94. Okada Y, Tsuboi S, Tsuda Y, Nakabayashi K, Nagamatsu Y, Yamamoto J

Synthesis of peptide fragments related to eglin c and examination of their inhibitory effect on human leukocyte elastase, cathepsin G and alpha-chymotrypsin.

Biochem Biophys Res Commun 1989; 161 : 272-275

95. Patrignani P, Del Maschio A, Bazzoni G, Daffonchio L, Hernandez A, Modica R, Montesanti L, Volpi D, Patrono C, Dejana E

Inactivation of endothelin by polymorphonuclear leukocyte-derived lytic enzymes.

Blood 1991; 78 : 2715-2720

96. Rami A, Ferger D, Kriegstein J

Blockade of calpain proteolytic activity rescues neurons from glutamate excitotoxicity.

Neurosci Res 1997; 27 : 93-97

97. Reddy VG

New therapies for acute respiratory distress syndrome (ARDS):--a review.

Med J Malaysia 1999; 54 : 132-145

98. Redl H

Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure.

Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany 1993; PP : 549-563

99. Remold-O'Donnell E

A fast-acting elastase inhibitor in human monocytes.

J Exp Med 1985; 162 : 2142-2155

100. Renesto P, Ferrer-Lopez P, Chignard M

Interference of recombinant eglin C, a proteinase inhibitor extracted from leeches, with neutrophil-mediated platelet activation.

Lab Invest 1990; 62 : 409-416

101. Ritacca FV, Stewart TE

Clinical review: High-frequency oscillatory ventilation in adults - a review of the literature and practical applications.

Crit Care 2003; 7 : 385-390

102. Robinson A

Inhibiting calpain, rescuing cells.

CMAJ 1996; 154 : 193-195

103. Rocco Jr TR, Reinert SE, Cioffi W, Harrington D, Buczko G, Simms HH

A 9-year, single-institution, retrospective review of death rate and prognostic factors in adult respiratory distress syndrome.

Ann Surg 2001; 233 : 414-422

104. Salamino F, Averna M, Tedesco I, DeTullio R, Melloni E, Pontremoli S

Modulation of rat brain calpastatin efficiency by post-translational modifications.

FEBS Lett 1997; 412 : 433-438

105. Sato K, Kadiiska MB, Ghio AJ, Corbett J, Fann YC, Holland SM, Thurman RG, Mason RP

In vivo lipid-derived free radical formation by NADPH oxidase in acute lung injury induced by lipopolysaccharide: a model for ARDS.

FASEBJ 2002; 16 : 1713-1720

- 106. Schalkwijk J, van den Berg WB, van de Putte LB, Joosten LA**
Elastase secreted by activated polymorphonuclear leucocytes causes chondrocyte damage and matrix degradation in intact articular cartilage: escape from inactivation by alpha-1-proteinase inhibitor.
Br J Exp Pathol 1987; 68 : 81-88
- 107. Schlag G**
Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany 1993; PP : 161-175,
- 108. Schleuning M, Schmid-Haslbeck M, Utz H, Jochum M, Heim M, Mempel W, Wilmanns W**
Complement activation during storage of blood under normal blood bank conditions. Effects of proteinase inhibitors and leukocyte depletion.
Blood 1992; 79 : 3071-3075
- 109. Schnebli HP, Seemuller U, Fritz H, Maschler R, Liersch M, Virca GD, Bodmer JL, Snider GL, Lucey EC, Stone PG**
Eglin c, a pharmacologically active elastase inhibitor.
Eur J Respir Dis Suppl 1985; 139 : 66-70
- 110. Schutte H, Lohmeyer J, Rosseau S, Ziegler S, Siebert C, Kielisch H, Pralle H, Grimminger F, Morr H, Seeger W**
Bronchoalveolar and systemic cytokine profiles in patients with ARDS, severe pneumonia and cardiogenic pulmonary edema.
Eur Respir J 1996; 9 : 1858-1867
- 111. Seeger W, Menger M, Walmrath D, Becker G, Grimminger F, Neuhofer H**
Arachidonic acid lipoxygenase pathways and increased vascular permeability in isolated rabbit lungs.
Am Rev Respir Dis 1987; 136 : 964-972
- 112. Seeger W, Neuhofer H, Hall J, Roka L**
Pulmonary vasoconstrictor response to soluble fibrin in isolated lungs: possible role of thromboxane generation.
Circ Res 1988; 62 : 651-659

113. Seeger W, Walmrath D, Menger M, Neuhoﬀ H

Increased lung vascular permeability after arachidonic acid and hydrostatic challenge.

J Appl Physiol 1986; 61 : 1781-1789

114. Seemüller U, Eulitz M, Fritz H, Strobl A

Structure of the elastase-cathepsin G inhibitor of the leech *Hirudo medicinalis*.

Hoppe Seylers Z Physiol Chem 1980; 361 : 1841-1846

115. Shiba E, Kim SJ, Kambayashi J, Kawamura I, Lacey E, Manda T, Shimomura K, Taguchi T, Takai S

Mechanism of growth inhibition by calpain inhibitor in MCF-7 cells.

Anticancer Res 1997; 17 : 1919-1923

116. Siebeck M, Hoffmann H, Geiger R, Schweiberer L

Leukocyte neutral proteinase inhibitor of the pig: modification by eglin C and superoxide dismutase of the response to shock.

Prog Clin Biol Res 1989; 308 : 945-951

117. Siebeck M, Hoffmann H, Weipert J, Spannagl M

Therapeutic effects of the combination of two proteinase inhibitors in endotoxin shock of the pig.

Prog Clin Biol Res 1989; 308 : 937-943

118. Siebeck M, Spannagl M, Hoffmann H, Fink E

Effects of protease inhibitors in experimental septic shock.

Agents Actions Suppl 1992; 38 (Pt 3) : 421-427

119. Smith CE, Stack MS, Johnson DA

Ozone effects on inhibitors of human neutrophil proteinases.

Arch Biochem Biophys 1987; 253 : 146-155

120. Snapper JR, Bernard GR, Brigham KL

In vivo oxidants and pulmonary inflammation.

Bull Eur Physiopathol Respir 1986; 22 : 257s-260s

121. Sorimachi H, Saido TC, Suzuki K

New era of calpain research. Discovery of tissue-specific calpains.

FEBS Lett 1994; 343 : 1-5

122. Steinmeyer J, Kalbhen DA

Pharmacological influence on polymorphonuclear granulocytes elastase under various test conditions.

Arzneimittelforschung 1990; 40 : 196-200

123. Steinmeyer J, Kalbhen DA

Influence of some natural and semisynthetic agents on elastase and cathepsin G from polymorphonuclear granulocytes.

Arzneimittelforschung 1991; 41 : 77-80

124. Stokke T, Burchardi H, Hensel I, Kostering H, Kathner T, Rahlf G

Continuous intravenous infusion of elastase in normal and agranulocytic minipigs-effects on the lungs and the blood coagulation system.

Resuscitation 1986; 14 : 61-79

125. Suter S, Schaad UB, Tegner H, Ohlsson K, Desgrandchamps D, Waldvogel FA

Levels of free granulocyte elastase in bronchial secretions from patients with cystic fibrosis: effect of antimicrobial treatment against *Pseudomonas aeruginosa*.

J Infect Dis 1986 ; 153 : 902-909

126. Suttorp N, Nolte A, Wilke A, Drenckhahn D

Human neutrophil elastase increases permeability of cultured pulmonary endothelial cell monolayers.

Int J Microcirc Clin Exp 1993; 13 : 187-203

127. Tao M, Bihovsky R, Wells GJ, Mallamo JP

Novel peptidyl phosphorus derivatives as inhibitors of human calpain I.

J Med Chem 1998; 41 : 3912-3916

128. Thompson VF, Lawson K, Goll DE

Effect of mu-calpain on m-calpain.

Biochem Biophys Res Commun 2000; 267 : 495-499

129. Tompa P, Baki A, Schad E, Friedrich P

The calpain cascade. Mu-calpain activates m-calpain.

J Biol Chem 1996; 271 : 33161-33164

130. Totani L, Cumashi A, Piccoli A, Lorenzet R

Polymorphonuclear leukocytes induce PDGF release from IL-1 β -treated endothelial cells: role of adhesion molecules and serine proteases.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18 : 1534-1540

131. Ueda Y, Wang MC, Ou BR, Huang J, Elce J, Tanaka K, Ichihara A, Forsberg NE

Evidence for the participation of the proteasome and calpain in early phases of muscle cell differentiation.

Int J Biochem Cell Biol 1998; 30 : 679-694

132. Urthaler F, Wolkowicz PE, Digerness SB, Harris KD, Walker AA

MDL-28170, a membrane-permeant calpain inhibitor, attenuates stunning and PKC epsilon proteolysis in reperfused ferret hearts.

Cardiovasc Res 1997; 35 : 60-67

133. Villa PG, Henzel WJ, Sensenbrenner M, Henderson CE, Pettmann B

Calpain inhibitors, but not caspase inhibitors, prevent actin proteolysis and DNA fragmentation during apoptosis.

J Cell Sci 1998; 111 (Pt 6) : 713-722

134. Wang KK, Posmantur R, Nadimpalli R, Nath R, Mohan P, Nixon RA, Talanian RV, Keegan M, Herzog L, Allen H

Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis.

Arch Biochem Biophys 1998; 356 : 187-196

135. Waydhas C, Nast-Kolb D, Jochum M, Trupka A, Lenk S, Fritz H, Duswald KH, Schweiberer L

Inflammatory mediators, infection, sepsis, and multiple organ failure after severe trauma.

Arch Surg 1992; 127 : 460-467

136. Weiland JE, Davis WB, Holter JF, Mohammed JR, Dorinsky PM, Gadek JE

Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. Clinical and pathophysiologic significance.

Am Rev Respir Dis 1986; 133 : 218-225

137. Yoshida K, Inui M, Harada K, Saido TC, Sorimachi Y, Ishihara T, Kawashima S, Sobue K

Reperfusion of rat heart after brief ischemia induces proteolysis of caldesmon (nonerythroid spectrin or fodrin) by calpain.

Circ Res 1995; 77 : 603-610

138. Yoshizawa T, Sorimachi H, Tomioka S, Ishiura S, Suzuki K

A catalytic subunit of calpain possesses full proteolytic activity.

FEBS Lett 1995; 358 : 101-103

139. Yoshizawa T, Sorimachi H, Tomioka S, Ishiura S, Suzuki K

Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions.

Biochem Biophys Res Commun 1995; 208 : 376-383

140. Zimmerman GA, Renzetti AD, Hill HR

Functional and metabolic activity of granulocytes from patients with adult respiratory distress syndrome. Evidence for activated neutrophils in the pulmonary circulation.

Am Rev Respir Dis 1983; 127 : 290-300

8 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Heinz Neuhof, unter dessen Anleitung und in dessen Abteilung diese Arbeit entstand, möchte ich für die Anregung zur Themenwahl, die kontinuierliche Betreuung und die Unterstützung bei der Lösung auftretender Probleme sowie die anregende wissenschaftliche Diskussion herzlich danken. Auch Frau Dr. Christiane Neuhof stand mir bei der Planung der Versuchsabläufe und der Gestaltung der Arbeit jederzeit mit Rat und Tat zur Seite.

Herr Harald Michnacs war sehr hilfreich bei der praktischen Umsetzung meiner geplanten Versuche; dabei besonders bei den Lungenpräparationen und der Beschaffung von Ersatzteilen für den extrakorporalen Kreislauf.

Frau Antje Weber danke ich für die Unterstützung bei der Isolierung der humanen Granulozyten und der Bestimmung von Elastase und Histamin in den Perfusatproben.

Frau Tiziana Wieth gilt meine persönliche Anerkennung in Bezug auf Ihre Unterstützung bei organisatorischen und redaktionellen Fragen und Ihre Hilfsbereitschaft und Ermunterung in schlechten Zeiten.

Desweiteren danke ich meinem Bruder Dirk Maybauer, für seine Unterstützung bei Organpräparationen, der Überwachung von Versuchsabläufen, der Durchsicht des Manuskripts und der enormen Hilfe im Bereich der Datenverarbeitung, sowie meinen Eltern Jutta und Manfred Maybauer für deren Geduld und Unterstützung im mentalen Bereich.

Ich danke auch Herrn Andreas Lohn, der mir bei der Ausarbeitung der graphischen Ergebnisse zur Seite stand, sowie allen Blutspendern, deren Namen aufgrund ihrer grossen Anzahl hier im Einzelnen nicht genannt werden können und dem Personal der Tierställe.

Ohne die Mithilfe all jener, wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

9 LEBENS LAUF

Name : Marc Oliver Maybauer

Geburtsdatum : 16.11.1971

Geburtsort : Gelnhausen

Schulbildung :

1978 – 1982 Grund- und Hauptschule Hailer-Meerholz

1982 – 1988 Kreisrealschule Gelnhausen

1988 – 1992 Berufliches Gymnasium Wirtschaft Gelnhausen

1992 Allgemeine Hochschulreife

Berufstätigkeit :

1992 – 1993 DRK-Rettungsdienst Gelnhausen, Zivildienst

1993 Ausbildung zum Rettungssanitäter

Studium :

1994 – 2000 Justus Liebig Universität Gießen

03/1997 Ärztliche Vorprüfung

08/1998 1. Staatsexamen

09/2000 2. Staatsexamen

05/2002 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr :

04/2001 – 08/2001 Chirurgie: Hochtaunus-Kliniken, Bad Homburg v.d.H.

08/2001 – 10/2001 Innere Medizin: University of Texas, Galveston, USA

10/2002 – 12/2001 Innere Medizin: Hochtaunus-Klinken, Bad Homburg v.d.H.

12/2001 – 03/2002 Orthopädie: Kantonsspital Winterthur, Schweiz

Profession:

08/2002 – 01/2004 Klinik für Anästhesiologie
Johannes Gutenberg Universität Mainz

02/2004 – dato Investigational Intensive Care Unit
University of Texas Medical Branch and Shriners Burns Hospital at
Galveston, Texas, USA